



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOLOGIA

SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE BIO-09

CICLO XXIII°

Tesi di Dottorato di Ricerca

Epilessia e canali voltaggio dipendenti del sodio: meccanismi  
patogenetici.

Dottorando: Dott. Giulia Bechi

Matricola: R07740

Tutor: Dott. Massimo Mantegazza  
Fondazione Istituto Neurologico Besta

Coordinatore: Prof. Paolo Cavallari

Anno Accademico 2007-2008



# INDICE

|   |         |
|---|---------|
| <b>Premessa Introduttiva</b>  | pag. I  |
| <b>Introduzione</b>   | pag. 1  |
| Evoluzione e geni dei canali voltaggio dipendenti del sodio   | pag. 3  |
| Struttura del canale voltaggio dipendente del sodio   | pag. 7  |
| Struttura tridimensionale del canale  | pag. 11 |
| Regolazione ed espressione funzionale   | pag. 11 |
| <u>Proteine regolatorie e modulatrici</u>   | pag. 14 |
| - <i>Subunità ausiliarie <math>\beta</math></i>   | pag. 14 |
| - <i>p11</i>  | pag. 20 |
| - <i>Anchirina</i>  | pag. 20 |
| - <i>Sintrofina</i>   | pag. 22 |
| - <i>Nedd</i>   | pag. 22 |
| - <i>FHFs</i>   | pag. 23 |
| - <i>BACE1 e P/S <math>\gamma</math>secretasi</i>   | pag. 24 |
| - <i><math>Ca^{2+}</math>, calmodulina e calmodulina chinasi II <math>Ca^{2+}</math>-dipendente</i> | pag. 26 |
| - <i>Proteine chinasi/fosfatasi</i>   | pag. 29 |
| - <i>Proteine G</i>   | pag. 30 |
| <u>Proteine regolatorie e modulatrici</u>   | pag. 31 |
| - <i>Papina</i>   | pag. 31 |
| - <i>Proteine ERM</i>   | pag. 32 |
| Canali del sodio, epilessia ed altri disordini neurologici  | pag. 32 |
| <u>BFNIS</u>  | pag. 36 |
| <u>GEFS+</u>  | pag. 38 |
| <u>SMEI</u>   | pag. 41 |
| <u>ICEGTC</u>   | pag. 45 |
| <u>Altre epilessie associate a mutazioni di SCN1A</u>   | pag. 45 |
| <u>Convulsioni Febrili</u>  | pag. 46 |
| <u>Epilessia Emiplegica Familiare</u>   | pag. 47 |
| <b>Materiali e metodi</b>   | pag. 52 |
| <b>Risultati progetto “Mutanti Tronchi”</b>   | pag. 64 |
| <b>Discussione progetto “Mutanti Tronchi”</b>   | pag. 75 |

|   |          |
|---|----------|
| <b>Risultati progetto “Mutanti folding Defective”</b>   | pag. 81  |
| <b>Discussione progetto “Mutanti folding Defective”</b> | pag. 96  |
| <b>Bibliografia</b>                                     | pag. 102 |

## Premessa Introduttiva

In questa tesi di dottorato presento due progetti finalizzati a fare maggior luce sui meccanismi patogenetici alla base del processo di epilettogenesi legato a mutazioni dell'isoforma  $\text{Na}_v1.1$  del canale voltaggio-dipendente del sodio. I canali voltaggio-dipendenti del sodio giocano un ruolo fondamentale nella generazione e nella propagazione di potenziali d'azione nei neuroni e in altre cellule eccitabili. Sono proteine di membrana composte da una subunità principale  $\alpha$ , che forma il poro attraverso il quale fluiscono gli ioni  $\text{Na}^+$ , e da subunità accessorie  $\beta$ . Mutazioni a carico dei geni che codificano per i canali voltaggio-dipendenti del sodio sono la causa più comune delle epilessie familiari; l'isoforma  $\text{Na}_v1.1$  è il *target* più frequente. Tuttavia la correlazione genotipo-fenotipo e gli effetti funzionali di queste mutazioni non sono stati ancora completamente chiariti.

Il primo progetto di cui mi sono occupata è relativo allo studio dell'effetto di mutazioni epilettogene dell'isoforma  $\text{Na}_v1.1$  del canale voltaggio-dipendente del sodio causanti l'epilessia SMEI (*severe myoclonic epilepsy of infancy*) detta anche sindrome di Dravet. Questo tipo di epilessia è un'encefalopatia epilettiforme farmaco-resistente, che insorge intorno al primo anno di vita e si manifesta con crisi generalizzate toniche, cloniche e tonico-cloniche inizialmente indotte da febbre. Come la maggior parte delle mutazioni  $\text{Na}_v1.1$  associate all'insorgenza di questa patologia, le due mutazioni oggetto di studio, R222X e R1234X, introducono un codone di stop prematuro causando la produzione di proteina trunca non funzionale. L'ipotesi più accreditata è che il meccanismo alla base dello sviluppo della SMEI sia riconducibile alla conseguente condizione di aploinsufficienza, cioè alla presenza di bassi livelli di proteina funzionale. Tuttavia, da studi effettuati in un modello murino di SMEI, che esprime l'isoforma  $\text{Na}_v1.1$  trunca, è emerso che la diminuzione di corrente osservata negli interneuroni di topi etero- ed omo-zigoti non è lineare (Yu et al., 2006); questo dato potrebbe essere spiegato con un effetto dominante-negativo della proteina trunca sul canale *wild type*, che risulta in un effetto proporzionalmente maggiore sui topi eterozigoti piuttosto che sugli omozigoti. Inoltre, nel 2001 Raghieb et al. hanno descritto come due mutanti tronchi del canale del calcio  $\text{Ca}_v2.2$ , associati all'insorgenza di atassia episodica di tipo 2, abbiano un effetto dominante-negativo sul canale *wild type*. Successivamente sono stati individuati mutanti tronchi di  $\text{Na}_v1.2$  e  $\text{Na}_v1.5$  con effetto dominante-negativo sulle rispettive isoforme *wild type* (Kamiya et al., 2004; Keller et al., 2005). Lo scopo di questo progetto è quindi verificare la possibilità che l'insorgenza di una patologia grave come la SMEI possa essere legata, oltre che a livelli di proteina funzionale troppi bassi, all'effetto dominante-negativo esercitato da mutanti tronchi di  $\text{Na}_v1.1$  su  $\text{Na}_v1.1$  stesso e sulle altre

isoforme maggiormente espresse nel sistema nervoso centrale, Nav1.2 e Nav1.6.

Per lo studio e la caratterizzazione dei due mutanti tronchi abbiamo scelto come sistema di espressione eterologa cellule tsA201 (un subclone delle cellule HEK, *human embryonic kidney*) e cellule HEK esprimenti in maniera costitutiva Nav1.6. Le cellule tsA201 sono state utilizzate per coesprimere i mutanti con le isoforme Nav1.1 e Nav1.2 del canale voltaggio-dipendente del sodio; le cellule HEK sono state invece utilizzate per studiare l'effetto dei mutanti sull'isoforma Nav 1.6 del canale del sodio voltaggio-dipendente. L'effetto dei canali mutanti trasfettati sull'espressione delle isoforme *wt* e sulle loro proprietà biofisiche è stato valutato mediante registrazioni elettrofisiologiche di *patch clamp* in configurazione *whole cell*.

I risultati ottenuti escludono un effetto dominante-negativo dei mutanti hNav1.1 R222X e hNav1.1 R1234X sull'espressione delle isoforme hNav1.1, hNav1.2 e hNav1.6; tuttavia, abbiamo osservato che entrambi i mutanti sono in grado di influenzare le proprietà di *gating* di hNav1.1 e hNav1.6 (rallentamento del recupero dell'inattivazione veloce), favorendo una condizione di ipoeccitabilità. Gli effetti osservati su queste isoforme si andrebbero a sommare, quindi, alla condizione di aploinsufficienza legata alla presenza di bassa proteina funzionale, contribuendo così alla gravità del fenotipo.

Nel secondo progetto abbiamo effettuato la caratterizzazione di mutazioni di Nav1.1 identificate in famiglie GEFS+ (*genetic epilepsy with febrile seizures plus*) con variabilità fenotipica particolarmente elevata e presenza di pazienti affetti da SMEI. L'epilessia GEFS+ presenta trasmissione autosomica dominante, è caratterizzata da una notevole variabilità fenotipica anche all'interno della stessa famiglia. Gli affetti mostrano infatti fenotipi estremamente diversi, che vanno da quadri clinici molto lievi (convulsioni febbrili tipiche, FS, o che persistono oltre i sei anni di età, FS+), a quadri clinici moderatamente gravi (FS+ associate a crisi di assenza/crisi miocloniche/crisi atoniche o epilessia mioclonica astatica), a quadri clinici estremamente gravi (SMEI). Recentemente il nostro gruppo ha descritto un meccanismo patogenetico legato a mutazioni di SCN1A, che potrebbe spiegare in parte l'elevata variabilità fenotipica riscontrata nell'epilessia GEFS+. Abbiamo infatti identificato due mutazioni causanti perdita di funzione localizzate nel C-terminale dell'isoforma hNav1.1, M1841T e R1916G, che compromettono il processo di *folding* del canale, determinandone la ritenzione nel reticolo endoplasmatico e la successiva degradazione. *In vitro* l'interazione con proteine accessorie o modulatorie è però in grado di ripristinare parzialmente l'espressione di questi mutanti; l'ipotesi è che anche *in vivo* l'interazione con proteine accessorie renda possibile il ripristino funzionale dei mutanti difettivi di *folding*. La variabilità individuale nell'espressione di tali proteine accessorie, alla quale oltretutto si somma l'espressione

differenziale che esse presentano nei diversi sottotipi neuronali, inciderebbe sulla capacità di queste proteine di interagire col canale mutante e di consentirne *il rescue*. Infatti, la presenza di mutazioni o polimorfismi nei promotori e/o nelle sequenze codificanti delle proteine accessorie condizionerebbe il livello di espressione e l'affinità di interazione con la subunità  $\alpha$ , il che si ripercuoterebbe sulla capacità di indurre un recupero funzionale del canale mutante e quindi, in ultima analisi, sulla gravità del fenotipo.

Lo scopo di questo secondo progetto è, quindi, verificare se questo meccanismo patogenetico è comune nelle epilessie familiari e se i difetti di *folding* sono legati a mutazioni in particolari domini del canale. Per questo motivo abbiamo ingegnerizzato le mutazioni M1653K, R393C, R1245Q, R1596C, Y790C, R859C, M956T, W1204R e V1366I, identificate in famiglie caratterizzate da elevata variabilità fenotipica e situate in segmenti e domini diversi del canale, nel clone umano di Na<sub>v</sub>1.1 e abbiamo verificato se alcuni di questi mutanti fossero *folding defective*.

Per lo studio e la caratterizzazione di questi mutanti abbiamo scelto come sistema di espressione eterologa cellule tsA201. L'effetto delle mutazioni è stato valutato mediante registrazioni elettrofisiologiche di *patch clamp* in configurazione *whole cell*.

Per identificare gli eventuali mutanti difettivi nel *folding* abbiamo testato l'azione esercitata dall'incubazione a ridotta temperatura, la quale spesso induce il *rescue* di questo tipo di mutanti. L'ipotesi corrente sostiene che si tratti di un effetto cinetico in base al quale il rallentamento dei processi, dovuto alla più bassa temperatura, darebbe alla proteina mutata maggiori probabilità di strutturarsi in maniera corretta (Bernier et al., 2004). Abbiamo poi studiato l'effetto di *chaperones* farmacologici, cioè sostanze a basso peso molecolare che interagiscono in maniera specifica con la proteina mutata (Cobbold et al., 2003; Bernier et al., 2004). Queste interazioni dovrebbero avere un effetto stabilizzatore sul *folding*, che consentirebbe alla proteina mutata di sfuggire al sistema di controllo qualità del reticolo endoplasmatico. Infine, poichè Rusconi et al. hanno dimostrato come il ruolo di *chaperon* possa anche essere svolto da proteine accessorie (Rusconi et al 2007; 2009), abbiamo voluto valutare l'effetto della coespressione della subunità  $\beta 1$  con i nostri mutanti.

Abbiamo così individuato tre nuove mutazioni (M956T, W1204R e V1366I) di Na<sub>v</sub>1.1, associate a famiglie GEFS+ in cui è presente un *range* piuttosto vario di fenotipi, che compromettono il meccanismo di *folding*, confermando che il mancato raggiungimento della forma nativa rappresenta un meccanismo patogenetico comune alle epilessie familiari. Inoltre, a differenza delle mutazioni precedentemente individuate da Rusconi et al., entrambe localizzate nella zona C-terminale del canale, le mutazioni che abbiamo caratterizzato sono distribuite in segmenti e domini diversi del canale. Questi dati, quindi, indicano che le

mutazioni che comportano il mancato raggiungimento del corretto *folding* del canale non sono localizzate in particolari *hot spots*, ma sono distribuite in maniera omogenea.



# INTRODUZIONE

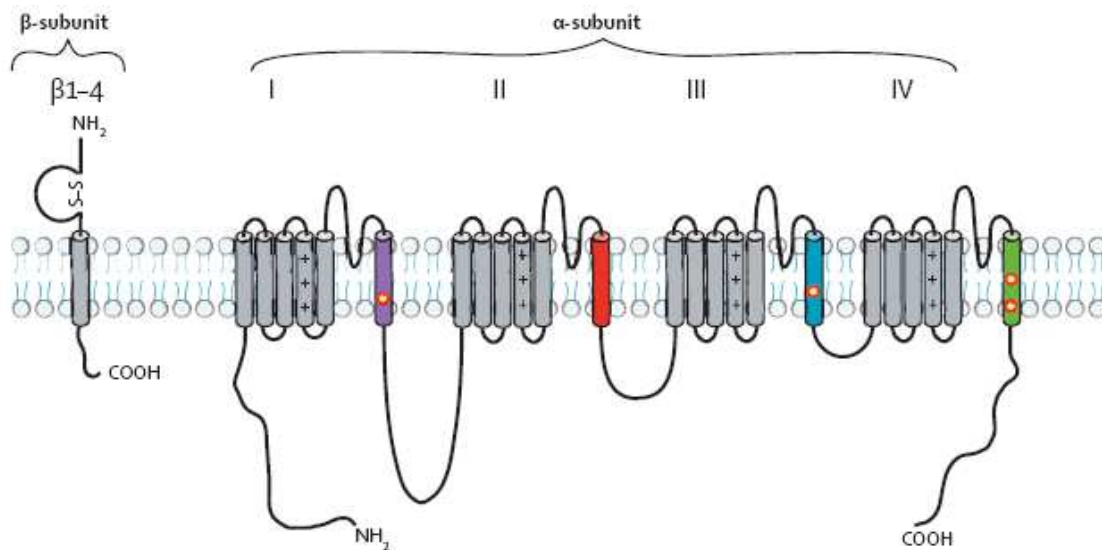
I canali voltaggio dipendenti del sodio giocano un ruolo fondamentale nella generazione e nella propagazione di potenziali d'azione nei neuroni e in altre cellule eccitabili, come miociti e cellule endocrine (Hodgkin and Huxley, 1952; Hille, 2001). Quando la membrana cellulare viene depolarizzata di pochi millivolt questi canali si attivano e inattivano nel giro di pochi millisecondi; il flusso di ioni che si genera con la loro apertura depolarizza ulteriormente la membrana e consente la fase di rapida salita del potenziale d'azione



**Fig.1: Struttura schematica del canale voltaggio-dipendente del sodio.** In blu è rappresentata la subunità principale  $\alpha$ , in marrone e in verde le subunità ausiliarie  $\beta 1$  e  $\beta 2$  (Ragsdale, 2008).

(Catterall, 2000). Esperimenti di marcatura con neurotossine, di purificazione e di ricostruzione funzionale hanno rivelato che queste proteine integrali di membrana sono costituite da una subunità principale  $\alpha$  di circa 260 kDa e da subunità accessorie  $\beta$  di circa 35 kDa (Catterall, 1984; 2000a) (Fig 1).

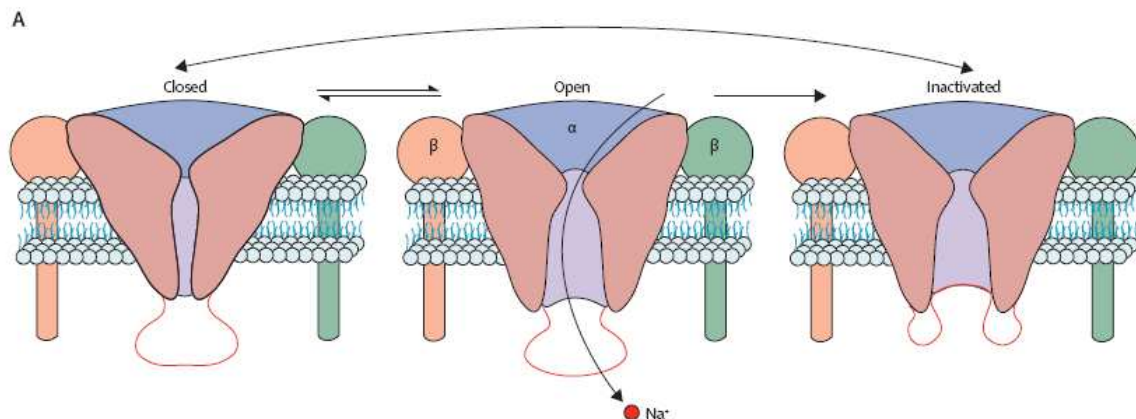
La subunità  $\alpha$ , che contiene il poro del canale e il sensore del voltaggio, è composta da quattro domini omologhi (D1-D4), ognuno dei quali è formato da sei segmenti  $\alpha$ -elica trans membrana (S1-S6) (Fig. 2).



**Fig.2: Struttura del canale voltaggio dipendente del  $\text{Na}^+$ .** La subunità principale  $\alpha$  è costituita da 4 domini (I-IV) ognuno dei quali a sua volta strutturato in 6 segmenti transmembrana. I cilindri rappresentano i segmenti transmembrana ad  $\alpha$ -elica. Le subunità ausiliarie  $\beta$  presentano un singolo segmento transmembrana, un piccolo dominio intracellulare e un loop extracellulare immunoglobulina-simile. I cerchietti in rosso rappresentano residui importanti per il legame di anestetici locali e bloccanti antiepilettici (Mantegazza et al, 2010).

I canali voltaggio dipendenti del sodio oscillano fra tre stati funzionali, in relazione al valore assunto dal potenziale di membrana: chiuso, aperto e inattivato (Fig. 3). Al potenziale di *resting* della membrana caratteristico dei neuroni quiescenti i canali si trovano nello stato

chiuso. In risposta ad una depolarizzazione della membrana essi passano dallo stato chiuso a quello aperto, che risulta in una corrente entrante di ioni sodio. Dopo pochi millisecondi dalla loro apertura i canali passano, a seguito di un fenomeno che prende il nome di inattivazione veloce, ad uno stato inattivato nel quale non conducono ioni. Il ritorno della membrana a potenziali più iperpolarizzati rende poi possibile il recupero dallo stato inattivato e la deattivazione, ossia il passaggio del canale dallo stato aperto allo stato chiuso. Il canale inoltre può anche andare incontro ad un processo di inattivazione lenta quando sottoposto a depolarizzazioni prolungate, un processo cineticamente e meccanicamente distinto da quello di inattivazione veloce.

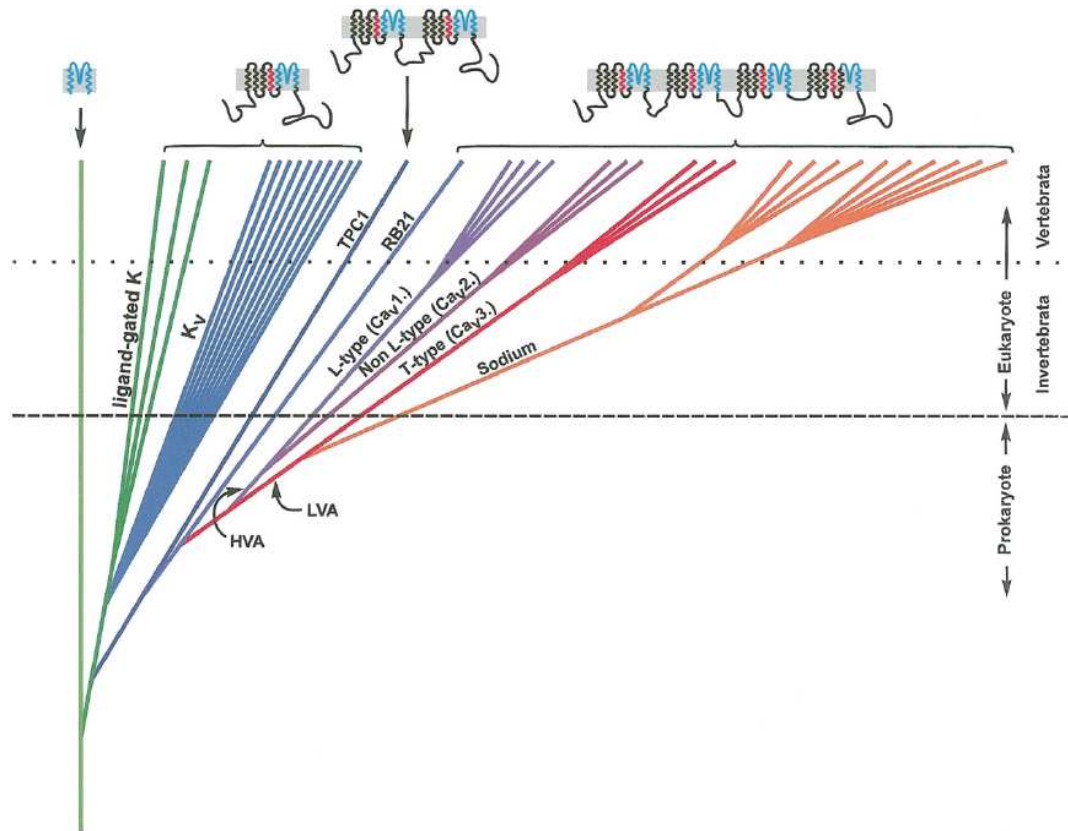


**Fig.3: Stati funzionali dei canali voltaggio dipendenti del sodio.** A potenziali di membrana iperpolarizzati il canale si trova nello stato chiuso. In seguito ad una depolarizzazione il canale si apre per un breve periodo, permettendo agli ioni  $\text{Na}^+$  di entrare nella cellula, e passa poi in uno stato inattivato in cui non conduce più ioni (Mantegazza et al, 2010).

### Evoluzione e geni dei canali voltaggio-dipendenti del sodio

I canali del sodio sono stati i primi membri della superfamiglia dei canali ionici ad essere scoperti; questa superfamiglia include anche i canali del potassio voltaggio-dipendenti, i canali di calcio voltaggio-dipendenti, i canali Trp-connessi (permeabili a vari cationi) e i canali dipendenti da nucleotidi ciclici (Hille, 2001). La famiglia dei canali del sodio è la famiglia di canali ionici voltaggio-dipendenti più recente, che si è evoluta da quella dei canali di calcio voltaggio-dipendenti, contenenti 4 domini omologhi. Questi, a loro volta, derivano probabilmente da due cicli di duplicazione dei geni ancestrali dei canali del potassio e dei canali nucleotidi ciclici-dipendenti, complessi tetramERICI costituiti da subunità a singolo dominio. L'apparizione dei quattro domini dei canali del sodio coincide con l'evoluzione dei metazoi, in cui il passaggio alle forme pluricellulari ha imposto la necessità di sviluppare un sistema nervoso capace di gestire e coordinare le funzioni dei vari tessuti, apparati e sistemi, portando allo sviluppo di neuroni e sinapsi (Hille, 2001; Anderson and Greenberg, 2001) (fig.4). I geni che codificano per i canali voltaggio dipendenti del sodio sono stati identificati in

diversi animali, incluse le mosche, le sanguisughe, i calamari e le meduse, tanto nei mammiferi quanto nei non-mammiferi vertebrati (Anderson and Greenberg, 2001; Goldin 2002). La similarità delle proprietà biofisiche, della farmacologia e dell'organizzazione dei geni che codificano per i canali del sodio negli invertebrati e nei mammiferi supporta l'ipotesi che i canali del sodio primordiali siano comparsi prima della separazione evolutiva fra vertebrati ed invertebrati (Plummer and Meisler, 1999).

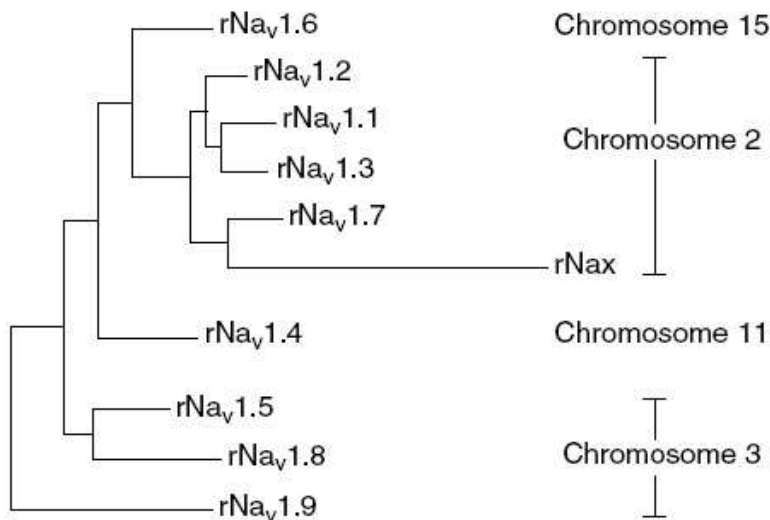


**Fig.4: Ipotetica filogenesi dei canali ionici voltaggio-dipendenti.** Secondo questo modello i canali del sodio si sono evoluti nel tempo a partire dai canali 2-TM dei procarioti. In seguito all'aggiunta di 4 segmenti, la proteina 6-TM ligando-dipendente avrebbe dato origine alla famiglia dei canali voltaggio-dipendenti del potassio (Kv) e a quella dei canali ligando-dipendenti del potassio. Due eventi di duplicazione genica avrebbero poi portato ai canali voltaggio-dipendenti del calcio dai quali infine si sarebbero originati i canali voltaggio-dipendenti di sodio (Anderson and Greenberg, 2001).

I geni che codificano per la subunità  $\alpha$  dei vertebrati, soprattutto quelli dell'uomo e dei roditori, sono i maggiormente caratterizzati. L'elevato livello di omologia nella sequenza aminoacidica (intorno al 50%) permette di raggrupparli in un'unica sottofamiglia. Fino ad oggi sono stati identificati dieci geni codificanti la subunità  $\alpha$ , nove dei quali sono stati espressi e funzionalmente caratterizzati. Le diverse isoforme mostrano distinta localizzazione (sistema nervoso centrale, sistema nervoso periferico, muscolo scheletrico e cardiaco) e lievi differenze nelle proprietà funzionali e farmacologiche. Tuttavia, contrariamente a quanto succede per i canali del potassio o del calcio, non sono state individuate delle sottofamiglie. In accordo con la convenzione dell'Unione Internazionale di Farmacologia (IUPHAR) la

nomenclatura dei canali ionici (ad esempio  $\text{Na}_v1.1$ ) consiste nel simbolo chimico del principale ione permeante il canale (Na) seguito dall'indicazione del principale regolatore fisiologico, scritto sotto forma di pedice ( $\text{Na}_v$ ). Con un numero viene poi indicata la sottofamiglia ( $\text{Na}_v1$ ) e il numero dopo il punto decimale specifica l'isoforma ( $\text{Na}_v1.1$ ). Quest'ultimo numero viene assegnato tenendo conto, per quanto possibile, dell'ordine di scoperta dei vari geni. Infine, le eventuali varianti di ogni isoforma sono contraddistinte con una lettera minuscola posta dopo il secondo numero ( $\text{Na}_v1.1a$ ) (Golding, 2000).

Dal punto di vista evolutivo i geni che codificano per i canali voltaggio-dipendenti del sodio sono raggruppabili in quattro gruppi; i membri di ogni gruppo mappano sullo stesso segmento cromosomico (Fig. 5). Questi segmenti cromosomici sono paraloghi<sup>1</sup> e contengono diversi *set* di geni correlati, inclusi i *cluster* di geni *homeobox*<sup>2</sup> (Plummer and Meisler, 1999).



**Fig.5: Albero filogenetico della subunità  $\alpha$  dei canali voltaggio dipendenti del sodio.** Sulla destra sono riportati i cromosomi umani su cui mappano gli ortologhi corrispondenti alle isoforme di ratto (Yu and Catterall, 2003).

I geni che codificano per le isoforme  $\text{Na}_v1.1$ ,  $\text{Na}_v1.2$ ,  $\text{Na}_v1.3$ ,  $\text{Na}_v1.7$  sono localizzati nel cromosoma 2 sia nell'uomo che nel topo; essi presentano un'elevata omologia di sequenza, caratteristiche biofisiche simili, sono altamente espressi nei neuroni e sono sensibili a concentrazioni nanomolari di tetrodossina (Golding, 2000).

Il secondo gruppo di geni, che codificano per le isoforme  $\text{Na}_v1.5$ ,  $\text{Na}_v1.8$  e  $\text{Na}_v1.9$ , mappa sul cromosoma umano 3p21-24 e nelle regioni ortologhe<sup>3</sup> del cromosoma 3 nel topo. Diversamente dal gruppo di canali localizzati sul cromosoma 2, con i quali hanno un'omologia di sequenza del 75% circa, essi sono poco sensibili alla tetrodotossina.  $\text{Na}_v1.5$  è altamente espresso nel cuore, mentre  $\text{Na}_v1.8$  e  $\text{Na}_v1.9$

<sup>1</sup> Geni paraloghi: geni originati dalla duplicazione di un unico gene nello stesso organismo.

<sup>2</sup> Geni *homeobox*: geni che contengono la sequenza *homeobox*, caratteristica di geni coinvolti nella regolazione dei pattern di sviluppo (morfogenesi).

<sup>3</sup> Regioni ortologhe: regioni omologhe, presenti in specie diverse ma correlate, che codificano per proteine con struttura e funzioni simili.

sono espressi nelle afferenze primarie sensoriali periferiche e giocano un ruolo fondamentale nella trasmissione dei segnali nocicettivi dalla periferia.

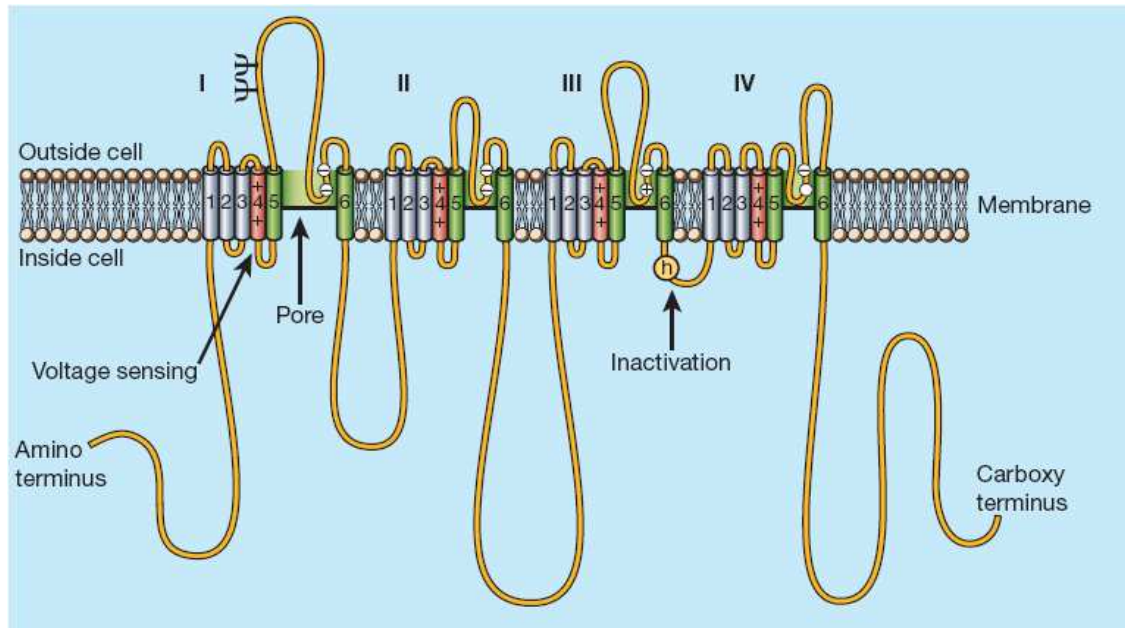
Le altre due isoforme,  $Na_v1.4$  e  $Na_v1.6$ , hanno un'omologia di sequenza dell'85% e proprietà funzionali simili alle isoforme del primo gruppo, inclusa la sensibilità alla tetrodossina.  $Na_v1.4$  è espresso principalmente nel muscolo scheletrico ed è codificato da un gene posto sul cromosoma umano 11 (cromosoma 17 nel topo), mentre  $Na_v1.6$  è espresso soprattutto nel sistema nervoso centrale (SNC) ed è codificato da un gene che mappa sul cromosoma umano 15 (cromosoma 12 murino) (Golding, 2000; Golding 2002). I canali indicati come  $Na_x$ , sebbene siano filogenicamente correlati al gruppo di canali del sodio che mappano sul cromosoma 2q23-24 (nel quale son anch'essi locati), costituiscono un gruppo a parte e non sono dei canali ionici (Goldin, 2000); è stato infatti scoperto (Watanabe et al., 2002) che non conducono ioni ma hanno la funzione di sensori delle concentrazioni di  $Na^+$ . Sono espressi nel cuore, nell'utero, nel muscolo liscio, negli astrociti e nei neuroni dell'ipotalamo e del sistema nervoso periferico.

Per quanto riguarda la localizzazione subcellulare delle isoforme di  $Na_v$  espresse a livello neuronale,  $Na_v1.2$  e  $Na_v1.6$  sono quelle presenti nell'AIS (*axon initial segment*) e nei nodi di Ranvier e la loro distribuzione può cambiare nel corso dello sviluppo in modo mielina-dipendente (Lai et al., 2006). Nel *loop* citoplasmatico tra il dominio II e III è stata identificata (Garrido et al., 2003) una sequenza consenso (residui 1102-1128: TVTVPIALGESDFENLNTEEFSSSDM) per l'associazione dell'anchirina-G, che è fondamentale per la localizzazione del canale nell'AIS. Ad ulteriore conferma dei loro dati Garrido et al. hanno dimostrato come questa sequenza sia sufficiente per rilocalizzare nell'AIS i canali del potassio  $K_v2.1$ , che hanno una localizzazione dendritica. Tale "*AIS motif*" è altamente conservato; lo si ritrova infatti nelle seguenti isoforme di canali voltaggio dipendenti del sodio:  $Na_v1.2$ ,  $Na_v1.1$ ,  $Na_v1.3$ ,  $Na_v1.6$ .

$Na_v1.1$  e  $Na_v1.3$  costituiscono invece le isoforme somato-dendritiche, anche se un recente articolo di Ogiwara I. et al. del 2007 sostiene una localizzazione specifica di  $Na_v1.1$  a livello dell'AIS in un sottogruppo di interneuroni (parvalbunina positivi). L'isoforma  $Na_v1.3$  è principalmente espressa durante la vita embrionale e neonatale per poi essere gradualmente rimpiazzata da  $Na_v1.1$  nei ratti, mentre nell'uomo i suoi livelli sembrano rimanere costanti (Chen et al., 2000). La recente individuazione della mutazione Lys354Gln di  $Na_v1.3$  in un paziente epilettico conferma l'ipotesi che l'espressione di questa isoforma persista nell'uomo anche dopo l'embriogenesi (Holland et al., 2008). Le isoforme  $Na_v1.6$ ,  $Na_v1.1$  e  $Na_v1.5$  sono inoltre espresse nella glia, dove si pensa possano svolgere un ruolo importante per alcune funzioni gliali, come l'attività fagocitica e la migrazione della microglia (Black et al., 2009).

## Struttura del canale voltaggio dipendente del sodio

Le prime analisi della struttura primaria dei canali voltaggi-dipendenti del sodio, effettuate da Noda et al. nel 1984, rivelarono l'organizzazione in 4 domini omologhi (DI-DIV), contenenti potenziali segmenti transmembrana ad  $\alpha$ -elica. L'utilizzo del *molecular modeling* portò in seguito ad una predizione più accurata della struttura del canale (Guy and Seetharamulu, 1986), che prevede 6 segmenti transmembrana (S1-6)  $\alpha$ -elica contenuti in ognuno dei 4 domini omologhi e un *loop* che si immerge nella regione transmembrana tra il segmenti S5-S6 a formare la porzione esterna del poro (Fig.6).



**Fig. 6: Rappresentazione schematica della struttura del canale voltaggio dipendente del  $\text{Na}^+$  ricavata da analisi di idrofobicità.** La subunità  $\alpha$  è costituita da 4 domini (I-IV) ognuno dei quali a sua volta strutturato in 6 segmenti transmembrana (1-6). I cilindri rappresentano i segmenti transmembrana ad  $\alpha$ -elica. Sono colorati in verde le porzioni che delimitano il poro, in rosso i sensori del voltaggio. I cerchi indicano le posizioni degli amminoacidi importanti per la conduttanza degli ioni e per la selettività. L' "h" cerchiata in giallo indica il motivo idrofobico IFMT nel cancello di inattivazione (Catterall, 2001).

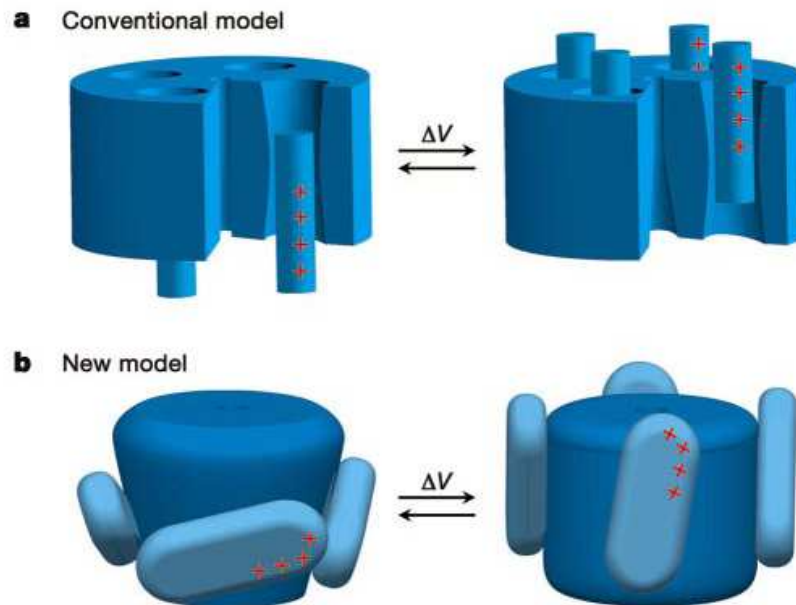
A livello del poro è presente il filtro di selettività che consiste in un anello formato da 4 aminoacidi, aspartato-glutammato-lisina-alanina (DEKA); mutazioni a carico di tale sequenza hanno infatti effetti rilevanti sulla selettività del canale per i cationi monovalenti organici ed inorganici (Schlieff, 1996; Sun, 1997). A conferma di tale ipotesi la sostituzione dei 4 aminoacidi con la corrispondente sequenza (EEEE) presente nel canale del calcio rende il canale selettivo nei confronti degli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  anziché di quelli  $\text{Na}^{+}$  (Heinemann et al., 1992b).

Sebbene la struttura del poro dei canali ionici venga in genere considerata essere piuttosto statica, esperimenti di *cross-linking* e di sostituzione di residui di cisteina tramite mutagenesi hanno suggerito che la struttura del poro è organizzata in modo asimmetrico (il

*loop* del dominio II è responsabile della formazione del poro è più superficiale, quello del dominio IV è più interno) e va incontro a cambiamenti dinamici, mostrando un significativo grado di flessibilità (Chiamvimonvant, 1996; Benitah, 1999; Catterall, 2001). Esperimenti basati sull'utilizzo di anestetici locali, che bloccano il canale agendo dall'interno, hanno invece portato alla conclusione che il segmento S6 costituisce la cavità interna del poro, immediatamente sotto il filtro di selettività (Striessnig et al., 1990).

La voltaggio-dipendenza dell'attivazione dei canali del sodio e di altri canali ionici voltaggio-dipendenti è legata al movimento di cariche verso l'esterno che avviene in risposta a cambiamenti nel potenziale elettrico nella membrana (Hodgkin and Huxley, 1952; Armstrong, 1981). Al segmento S4, ricco di aminoacidi carichi positivamente, è stato attribuito il ruolo di sensore del voltaggio. S4 infatti contiene una sequenza in cui si ripetono, ogni tre posizioni, un aminoacido carico positivamente e due aminoacidi idrofobici, e su di esso viene dunque esercitata una forte attrazione da parte della faccia interna della membrana, carica negativamente in condizioni di riposo. Secondo il modello della "*sliding helix*" (Catterall et al., 1986) o dell'"*helical screw*" (Guy and Seetharamulu., 1986), le cariche positive verrebbero stabilizzate dall'appaiamento con residui carichi negativamente presenti nei segmenti transmembrana adiacente. La depolarizzazione indurrebbe una rotazione verso l'esterno del segmento S4, con conseguenti cambiamenti conformazionali che portano all'apertura del poro (Fig.7A). Lo slittamento dell'elica verso l'esterno avverrebbe in modo tale da garantire sempre la formazione di appaiamenti tra residui acidi e basici (ovviamente i membri delle coppie sarebbero diversi rispetto a quelli che si osservavano in condizioni di riposo), appaiamento che ha un ruolo stabilizzante su S4. Studi strutturali (Catterall, 2001) mostrano l'esistenza di quattro pori periferici localizzati nella regione transmembrana di ogni dominio attraverso i quali si verificherebbe quindi lo scivolamento dell'elica S4. Altri esperimenti sembrano confermare la teoria della "*sliding helix*" o "*helical screw*". Ad esempio la neutralizzazione di residui carichi positivamente nel segmento S4 del dominio I (Stuhmer et al., 1989) causa una riduzione della pendenza della voltaggio-dipendenza dell'attivazione, il che supporta il coinvolgimento delle cariche positive presenti su S4 nell'apertura del canale. Yang, George e Horn (Yang e Horn, 1995; Yang et al., 1996) hanno invece utilizzato dei canali mutati in cui gli aminoacidi carichi di S4 sono stati sostituiti con delle cisteine e hanno valutato come varia la velocità di reazione tra queste cisteine e dei reagenti sulfidrilici, in funzione del potenziale di membrana. Si osserva come l'accessibilità delle cisteine, man mano che la membrana si depolarizza, aumenti nei confronti di reagenti extracellulari e diminuisca nei confronti di reagenti intracellulari; ciò è in accordo con l'idea di movimento verso l'esterno di S4 al depolarizzarsi della membrana.



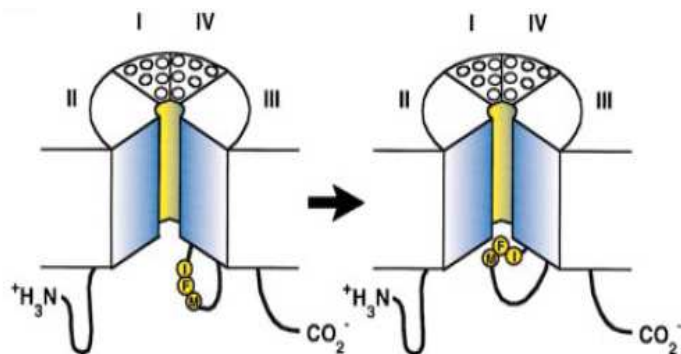


**Fig.7: Modelli ipotetici di apertura del canale.** A) Modello *sliding helix*: I residui su S4 (rappresentato con un cilindro) caricati positivamente (in rosso) sono neutralizzati dall'interazione con i residui carichi negativamente presenti principalmente su S2 e S3. In seguito a depolarizzazione il segmento S4 si muove verso l'esterno ruotando in modo da permettere alle cariche positive di interagire con residui carichi negativamente posti più esternamente. B) Modello *paddle*: il movimento del motivo *paddle* (costituito dal segmento S4 e parte di S3) verso l'interfaccia proteine-lipidi porta allo spostamento delle cariche positive lungo la membrana, provocando l'apertura del poro (Jiang et al., 2003a).

Nel 2003 Jiang et al. hanno proposto un modello alternativo allo *sliding helix*, il “*paddle model*”. La componente principale di questo modello, basato sulla risoluzione cristallografica della struttura del canale per il  $K^+$  batterico  $K_vAP$ , è una struttura *paddle-like* formata dal segmento S4 e dalla parte terminale del segmento S3 (Fig.7B). Questa struttura *helix-turn-helix* si trova nel perimetro esterno del canale ed è attaccata al corpo del canale attraverso connessioni flessibili; il suo movimento (circa 15-20Å) verso l'interfaccia proteine-lipidi consentirebbe lo slittamento dei residui di arginina presenti sul motivo *paddle* lungo il campo elettrico della membrana, portando così all'apertura del poro (Jiang et al., 2003a; 2003b).

Il segmento S4 del dominio IV è coinvolto anche nell'accoppiamento tra attivazione e inattivazione: il suo movimento verso l'esterno sembra rappresentare il segnale per l'avvio dei meccanismi di inattivazione (Armstrong, 1981). E' stato dimostrato infatti che mutazioni di aminoacidi carichi presenti all'estremità di questo segmento influiscono pesantemente sull'inattivazione (Chen et al., 1996). Inoltre la tossina  $\alpha$  dello scorpione e la tossina dell'anemone di mare disaccoppiano attivazione e inattivazione legandosi ad un sito posto all'estremità extracellulare di S4 DIV, bloccandolo così in una posizione adatta a permettere l'attivazione ma non l'inattivazione rapida (Rogers et al., 1996; Sheets et al., 1999).

L'inattivazione veloce del canale, che si manifesta a pochi millisecondi di distanza dalla sua apertura, è dipendente invece dal *loop* citoplasmatico tra i domini III e IV. Solamente gli anticorpi diretti contro questa piccola porzione di canale hanno un effetto inibitorio



**Fig.8: Meccanismo di inattivazione del canale del sodio.** Cerchietti in giallo sono rappresentati i residui presenti sul *loop* intracellulare che connette DIII con DIV, cruciali per l'inattivazione del canale (Catterall, 2000).

sull'inattivazione rapida

(Vassilev et al., 1988, 1989).

Anche l'espressione del canale in due parti separate, senza *loop* citoplasmatico, rallenta

significativamente l'inattivazione veloce (Stuhmer et al., 1989).

Studi di mutagenesi indicano inoltre che la porzione cruciale per l'inattivazione è costituita da

una sequenza di tre aminoacidi idrofobici: isoleucina, fenilalanina, metionina (IFM) (West et al., 1992). Si ritiene che essi determinino inattivazione occludendo il poro attraverso il legame a regioni adiacenti; da qui il nome di meccanismo "*hinged lid*" simile a quello detto di "*ball and chain*" tipico dei canali del  $K^+$  (Fig. 8). La regione che costituisce il sito di legame del *loop* di inattivazione non è stata ancora identificata con sicurezza; le aree candidate sono molteplici, dalla porzione citoplasmatica terminale del segmento S6 del dominio IV al *loop* intracellulare tra S4 e S5 dei domini III e IV (Catterall, 2000). L'inattivazione lenta è un processo cineticamente distinto (scala temporale di secondi contro i millisecondi tipici dell'inattivazione veloce) che interessa regioni del canale diverse da quelle implicate nell'inattivazione veloce, tanto che i trattamenti (enzimi, tossine, mutazioni) che aboliscono l'inattivazione rapida non hanno effetto su quella lenta. Un'ipotesi per spiegare l'inattivazione lenta si fonda su riarrangiamenti strutturali del poro, con un meccanismo simile a quello che regola l'inattivazione dei canali del potassio di tipo C (Liu et al., 1996); il processo di inattivazione lenta tuttavia probabilmente comporta cambiamenti conformazionali anche in altre zone, quali il segmento S4 del dominio IV (Mitrovic et al., 2000), il segmento S6 del dominio II (O'Reilly et al., 2001) e il linker tra S5 e S6 del dominio II (Vilin et al., 2001). Ad esempio, la sostituzione di un solo aminoacido nel segmento S6 del dominio II altera le cinetiche di inattivazione lenta in  $Na_v1.4$ : la sostituzione della valina 787 con una cisteina rallenta il processo, con una lisina lo accelera (O'Reilly et al., 2001).

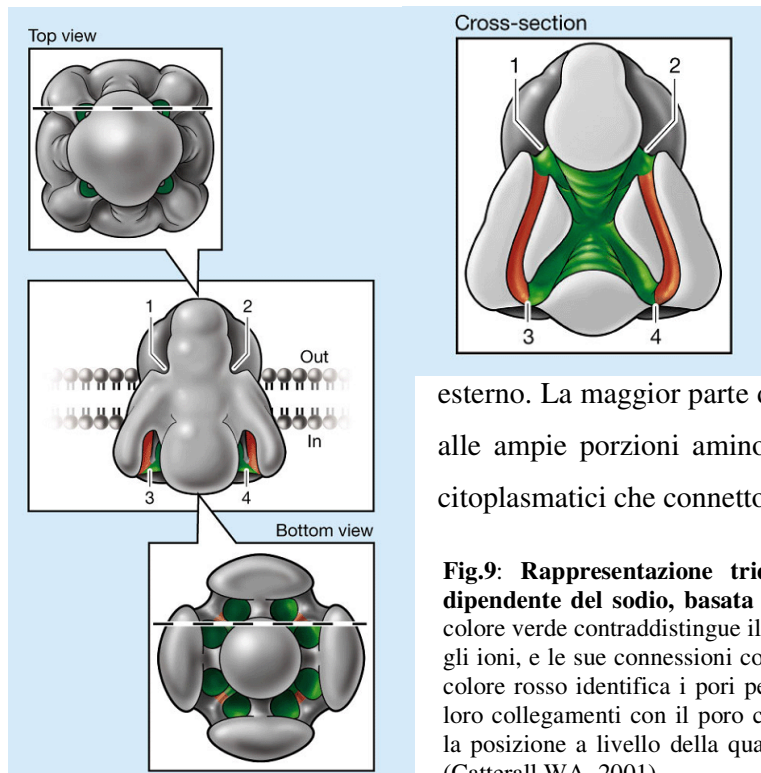
## Struttura tridimensionale del canale

Nel 2001 gli esperimenti di Sato et al. hanno portato alla determinazione della struttura del canale con una risoluzione di 19Å, grazie a studi di microscopia crio-elettronica e di ricostruzione dell'immagine. Le immagini ottenute mostrano quattro masse transmembrana disposte in maniera simmetrica intorno ad un asse centrale perpendicolare alla membrana (Fig.9). L'asse centrale è marcato intensamente dagli ioni in soluzione nel bagno, a conferma del fatto che i quattro domini dei canali del sodio sono arrangiati in maniera simmetrica intorno ad un poro centrale. Il poro centrale, però, non è direttamente in connessione con la soluzione intra- ed extra-cellulare, ma si ramifica in quattro cavità. Sono stati inoltre evidenziati quattro pori periferici, uno per ogni dominio, che probabilmente rappresentano le cavità attraverso le quali si verifica il movimento dei sensori del voltaggio

S4 in seguito alle variazioni di potenziale transmembranario.

Guardando il canale in modo parallelo rispetto alla membrana questo assume una forma a campana, con il 47% della sua massa interno alla membrana plasmatica e il 27%

esterno. La maggior parte della massa intracellulare è dovuta alle ampie porzioni amino- e carbossi-terminale e ai *loops* citoplasmatici che connettono i domini.



**Fig.9: Rappresentazione tridimensionale del canale voltaggio dipendente del sodio, basata su immagini di Sato et al., 2001.** Il colore verde contraddistingue il poro centrale, attraverso cui fluiscono gli ioni, e le sue connessioni con l'ambiente intra ed extracellulare. Il colore rosso identifica i pori periferici, contenenti i segmenti S4, e i loro collegamenti con il poro centrale. Le linee tratteggiate indicano la posizione a livello della quale è stata fatta la sezione trasversale. (Catterall WA, 2001)

## Regolazione ed espressione funzionale

Allo stesso modo di altre proteine, anche i canali del sodio vengono regolati a livello trascrizionale, post-trascrizionale/pre-traduzionale, traduzionale e post-traduzionale. Ad oggi sono stati identificati diversi ormoni e fattori di crescita che giocano un ruolo fondamentale nella trascrizione di questi canali (Boixel et al., 2006; Brackenbury and Djamgoz, 2007; Ding

et al., 2008; Fahmi et al., 2004; Okuse et al., 1997). Studi sulla regione 5' delle isoforme Na<sub>v</sub>1.2 e Na<sub>v</sub>1.5 hanno portato all'individuazione di diversi siti deputati alla regolazione ad opera di fattori di trascrizione ed ormoni (Schade and Brown, 2000; Shang and Dudley, 2005; Yang et al., 2004). Fenomeni di *splicing* alternativo si verificano non solo nella regione codificante del canale, ma anche nelle regioni 3' e 5' non-tradotte (UTR) (Diss et al., 2004; Shang and Dudley, 2005); i trascritti che ne derivano vengono poi regolati in maniera diversa dagli ormoni steroidei durante lo sviluppo (Fahmi et al., 2004; Shang and Dudley, 2005). La regolazione dell'espressione dei canali del sodio voltaggio dipendente viene inoltre regolata dall'azione di microRNA, che sembrano agire a livello post-trascrizionale e pre-traduzionale (Bushati and Choen, 2007).

Dopo il processo di traduzione, il canale va incontro a fenomeni di fosforilazione, glicosilazione e *trafficking*<sup>4</sup>, che ne permettono la maturazione e la successiva espressione funzionale (Stocker and Bennet, 2006; Zhou et al., 2002).

Le subunità  $\alpha$  e  $\beta$  dei canali voltaggio dipendenti del sodio sono altamente glicosilate, essendo costituite per circa il 30% della loro massa totale da carboidrati. Le catene glicosidiche spesso terminano con residui di acido sialico che risultano carichi negativamente a pH fisiologico. Recenti studi hanno evidenziato come l'acido sialico sia un importante modulatore del *gating* della subunità  $\alpha$ . La rimozione enzimatica dei residui di acido sialico infatti comporta uno spostamento depolarizzante del *gating* del canale del sodio (Recio Pinto et al., 1990; Bennet et al., 1997). Bennet nel 2002 ha dimostrato che il *gating* di hNa<sub>v</sub>1.4, ma non quello di hNa<sub>v</sub>1.5, è dipendente dai residui di acido sialico. Per raggiungere questo risultato si è avvalso di due linee cellulari di CHO (*Chinese Hamster Ovary Cells*), Pro5 e Lec2. Le cellule Pro5 sono in grado di provvedere normalmente alla sialilazione, mentre la linea cellulare Lec2 è deficitaria di un enzima chiave del processo di sialilazione. Facendo esprimere le due isoforme del canale del sodio in queste due linee cellulari e confrontando le principali proprietà biofisiche dei canali (voltaggio dipendenza, cinetiche di recupero) ha potuto discriminare il diverso ruolo dei residui di acido sialico. Inoltre attraverso la costruzione di chimere, costituite da porzioni di hNa<sub>v</sub>1.4 e hNa<sub>v</sub>1.5, ha scoperto che i residui di acido sialico funzionalmente importanti per la modulazione sono quelli localizzati nel primo dominio, più precisamente nella regione S5-S6, di hNa<sub>v</sub>1.4. La capacità modulatoria esercitata da parte dei residui di acido sialico può essere dovuta al fatto che il *gating* dei canali è strettamente dipendente dal potenziale di membrana e qualsiasi fenomeno che alteri il potenziale di membrana a sua volta influisce sul *gating*. Le cariche negative apportate dai

---

<sup>4</sup> *Trafficking*: un processo che consiste nel trasporto delle proteine dal sito di sintesi al compartimento di destinazione.

residui di acido sialico sono teoricamente equivalenti a delle cariche positive presenti sul lato interno della membrana, il che determinerebbe una depolarizzazione della membrana e un avvicinamento al potenziale soglia per l'attivazione dei canali. Infatti le alterazioni delle proprietà del canale del sodio che si registrano in presenza di normale sialilazione sono tali da favorire l'attivazione del canale.

Gli effetti della fosforilazione dei canali voltaggio-dipendenti del sodio sono molteplici e diversi, in base al sito e allo stadio in cui la fosforilazione avviene, e possono indurre cambiamenti sia nelle loro proprietà funzionali che nella loro espressione (Scheuer, 1994). Le proteine chinasi che possono influire sul *trafficking* dei canali voltaggio-dipendenti del sodio maturi sono diverse; tra queste PKA e PKC, due proteine chinasi. Tuttavia il loro ruolo nel *trafficking* di questi canali non è ancora stato studiato in dettaglio (Ahnet et al., 2007; Brackenbury and Djamgoz, 2006; Jespersen et al., 2006). Il *trafficking* intracellulare in genere è un processo piuttosto complesso, che viene finemente regolato. Diverse evidenze indicano il coinvolgimento di chaperon, glicosidasi, microtubuli, vescicole di trasporto e componenti dell'apparato del Golgi, actine del citoscheletro e proteine di ancoraggio (Steele et al., 2007).

Un requisito fondamentale per l'espressione funzionale del canale in membrana è il superamento del controllo di qualità: solo le proteine che assumono la corretta struttura tridimensionale, o forma nativa, vengono esportate dal reticolo endoplasmatico (ER). Uno di questi meccanismi di controllo, ad esempio, prevede il legame delle proteine 14-3-3<sup>5</sup> al motivo di ritenzione nel reticolo endoplasmatico, RXR (Boyle et al. 2006; Renigunta et al., 2006), presente nel loop che unisce DI-DII di Na<sub>v</sub>1.5 (Allouis et al., 2006). Questo motivo è anche responsabile della ritenzione di Na<sub>v</sub>1.8 nel reticolo endoplasmatico; l'associazione della subunità  $\alpha$  con la subunità accessoria  $\beta 3$  maschera questo motivo promuovendo l'espressione del canale in membrana (Zhang et al., 2008). Sebbene questo motivo sia stato identificato in altri canali voltaggio-dipendenti del sodio la sua funzione non è stata ancora completamente chiarita. E' noto tuttavia che la fosforilazione di serine adiacenti al motivo RXR ad opera di proteine kinasi A potrebbe giocare un ruolo chiave nel *trafficking* di Na<sub>v</sub>1.5 (Zhou et al., 2002).

Uno dei *pathway* di degradazione proteolitica al livello del reticolo endoplasmatico maggiormente conosciuti è quello ubiquitina-dipendente. Questo *pathway* prevede due *step* principali: l'aggiunta di catene di molecole di ubiquitina alla proteina da degradare e la proteolisi della proteina ubiquitinata ad opera del proteasoma (Nandi et al., 2006). Questo sistema può degradare subunità non assemblate di canali o recettori oligomerici (Christianson

---

<sup>5</sup> Le 14-3-3 sono una famiglia di proteine dimeriche che svolgono un ruolo fondamentale nel controllo di processi fisiologici come il differenziamento e la proliferazione cellulare, l'esocitosi, l'apoptosi, il *targeting* cellulare e nel coordinamento di molteplici vie di trasduzione di segnali cellulari.

and Green, 2004), e può quindi andare ad influenzare l'espressione delle proteine sulla membrana plasmatica regolandone il traffico "in uscita" e/o internalizzandone /degradandole. Ci sono diverse evidenze che indicano il coinvolgimento del *pathway* ubiquitina-dipendente nella regolazione dei canali voltaggio dipendenti del sodio. Ad esempio è stato dimostrato che alcune proteine della famiglia delle ubiquitine Nedd4<sup>6</sup> sono in grado di legare Na<sub>v</sub>1.5 e abbassarne i livelli di espressione (van Bemmelen et al., 2004). Inoltre Na<sub>v</sub>1.1, Na<sub>v</sub> 1.3, Na<sub>v</sub> 1.5 e Na<sub>v</sub> 1.8 presentano un motivo C-terminale altamente conservato, PY, che permette il legame ai domini WW (domini deputati al riconoscimento delle sequenze PY) di Nedd4 e Nedd4-2 (Fotia et al., 2004).

Le proteine, finora identificate, che interagiscono con i canali voltaggio-dipendenti del sodio, sono quindi numerose e tali interazioni possono essere coinvolte in maniera differente nel *trafficking* e nell'espressione funzionale.

### Proteine regolatorie e modulatorie

#### *Subunità ausiliarie $\beta$*

Le subunità ausiliarie  $\beta$  ad oggi identificate sono Na<sub>v</sub> $\beta$ <sub>1</sub>, Na<sub>v</sub> $\beta$ <sub>2</sub>, Na<sub>v</sub> $\beta$ <sub>3</sub> e Na<sub>v</sub> $\beta$ <sub>4</sub>, codificate rispettivamente dai geni SCN1B, SCN2B, SCN3B e SCN4B (tab. 1) (Catterall, 2000; Isom, 2001; Yu, 2004); la subunità  $\beta$ 1 può essere espressa anche come variante di *splicing*  $\beta$ 1A (conosciuta anche come  $\beta$ 1B) (Kazen-Gillepsie et al., 2000; Qui net al., 2003). Le subunità  $\beta$ 1,  $\beta$ 1A e  $\beta$ 3 si associano in maniera non-covalente alla subunità  $\alpha$  (Isom et al., 1992; Morgan et al., 2000) mentre le subunità  $\beta$ 2 e  $\beta$ 4 formano legami disolfuro con la subunità principale (Isom et al., 1995; Yu et al., 2003).

(B) The  $\beta$  Subunits

| Protein                  | Gene Symbol (Human) | Tissue Location                            |
|--------------------------|---------------------|--|
| $\beta$ 1                | SCN1B               | Heart, skeletal muscle, CNS, glia, PNS     |
| $\beta$ 1A ( $\beta$ 1B) | SCN1B               | Heart, skeletal muscle, adrenal gland, PNS |
| $\beta$ 2                | SCN2B               | CNS, PNS, heart, glia                      |
| $\beta$ 3                | SCN3B               | CNS, adrenal gland, kidney, PNS            |
| $\beta$ 4                | SCN4B               | Heart, skeletal muscle, CNS, PNS           |

Abbreviations: VGSC = voltage-gated Na<sup>+</sup> channel; PNS = peripheral nervous system; DRG = dorsal root ganglia.

**Tab. 1: Isoforme della subunità  $\beta$  ed espressione tissutale.** (Brackenbury et al., 2008)

Le subunità  $\beta$  sono proteine multifunzionali che accelerano le cinetiche di gating del canale, spostano la voltaggio dipendenza e ne incrementano l'espressione funzionale quando espresse *in vitro* (Isom et al., 1992). Queste subunità possono inoltre funzionare come le molecole di adesione della superfamiglia delle immunoglobuline (IGSF-CAMs) promovendo

<sup>6</sup> Nedd4: enzimi deputati alla ligazione dell'ubiquitina alle sue molecole bersaglio.

l'adesione *in vitro*, sia in presenza che in assenza della subunità principale  $\alpha$  (Isom and Catterall, 1996; Malhorta et al., 2000; WcEwen et al., 2004).

La subunità  $\beta 1$ , di circa 36 kDa, è codificata dal gene SCN1B, che mappa sul cromosoma 19q13.1-q13.2. Il dominio extracellulare di  $\beta 1$ , che presenta una profonda omologia con la proteina mielina P<sub>0</sub> (una CAM<sup>7</sup>), presenta un motivo “*Ig-fold*”, che consiste in un “*sandwich*” di due foglietti  $\beta$  stabilizzati da interazioni idrofobiche. È probabile che i residui idrofobici stabilizzino la struttura *Ig-fold*, una sorta di impalcatura sulla quale sono esposte le porzioni di  $\beta 1$  essenziali per l'associazione funzionale con la subunità  $\alpha$ , come ad esempio i residui carichi negativamente presenti nei  $\beta$  *strands* A/A' (McCormick et al., 1998). Un altro dominio di interazione tra subunità  $\alpha$  e  $\beta 1$ , messo in evidenza da Spanpanato et al. nel 2004, coinvolge la porzione intracellulare di  $\beta 1$  e i residui compresi tra K1846 e K1886 nel C-terminale della subunità  $\alpha$ . Biskup et al. nel 2004 hanno effettuato esperimenti di FRET<sup>8</sup> (*forster energy resonance transfer*) in cellule HEK (*human embryonic kidney cells*) trasfettate con le subunità  $\alpha$  e  $\beta 1$  fuse con le proteine fluorescenti YFP (*yellow fluorescent protein*) and CFP (*cyan fluorescent protein*). Attraverso tali esperimenti hanno dimostrato che le due subunità interagiscono a livello del reticolo endoplasmatico e sono trasportate come complesso sulla membrana plasmatica.

I risultati ottenuti con la coespressione di subunità  $\alpha$  e  $\beta 1$  sono fortemente influenzati dal sistema di espressione eterologo adottato e dall'isoforma di subunità  $\alpha$  scelta. Infatti, la disomogeneità di risultati, ottenuti in oociti di *Xenopus* (Krafte et al., 1990; Moorman et al., 1990; Zhou et al., 1991; Isom et al., 1992; Patton et al., 1994) e in cellule di mammifero (Ukomadu et al., 1992; West et al., 1992; Isom et al., 1995; Isom et al., 1995; Isom et al., 1995b; Qu et al., 2001), ha impedito di fare chiarezza sugli effetti funzionali della subunità  $\beta 1$  sulla subunità principale  $\alpha$ . Tuttavia in svariati lavori è stato dimostrato che uno degli effetti della coespressione della  $\beta 1$  consiste nell'aumento di almeno due volte dei livelli di canale del sodio sulla membrana plasmatica (Isom et al., 1995a e b; Isom, 2000; Meadows et al., 2001; Tammamro et al., 2002). Inoltre, McEwen et al. nel 2004 hanno dimostrato che tutti i domini della subunità  $\beta 1$  devono essere intatti perché si possa realizzare il massimo incremento nella densità dei canali del sodio in membrana. Si ritiene che la subunità  $\beta 1$  (ma anche la  $\beta 2$ ) vada a

---

<sup>7</sup> CAM: molecola di adesione cellulare.

<sup>8</sup> FRET: tecnica che sfrutta il trasferimento di energia tra due cromofori/fluorofori per valutare l'interazione tra due proteine. Le due proteine di interesse sono fuse con due proteine fluorescenti, aventi spettri di eccitazione/emissione parzialmente sovrapposti, che svolgono il ruolo di donatore e accettore (tradizionalmente si utilizza la coppia YFP-CFP). Se le proteine non interagiscono tra loro, l'eccitazione del donatore porta a rilevare soltanto l'emissione di fotoni da parte del donatore stesso. Se invece le due proteine sono sufficientemente vicine (meno di 10 nm circa), all'eccitazione del donatore fa seguito quella dell'accettore ed è quindi rilevata l'emissione di fotoni anche da parte dell'accettore.

legare le subunità  $\alpha$ , presenti come *pool* libero nel citoplasma, inducendone la traslocazione in membrana, sottolineando il ruolo della  $\beta 1$  nel regolare la densità e la localizzazione dei canali del sodio. Un aspetto che non ha ancora trovato una spiegazione consiste nel fatto che a questo aumento del numero di canali in membrana non corrisponda un paragonabile aumento di corrente. Un'ipotesi (Meadows et al., 2001) sostiene che la  $\beta 1$  forse induca l'espressione di canali silenti. Esistono comunque anche dei lavori in cui non viene evidenziato alcun aumento della densità dei canali in presenza di  $\beta 1$  (Morgan et al., 2000).

La subunità  $\beta 1$  sembra avere un duplice ruolo, non solo di modulazione della subunità  $\alpha$  ma anche di molecola di adesione cellulare. In diversi lavori (Kordeli et al., 1990; Davis et al., 1996; Lustig et al., 2001) è stato dimostrato che gli aggregati di neurofascina e NrCAM si uniscono agli aggregati di anchirina e canali del sodio durante la differenziazione degli assoni mielinati, portando poi alla formazione dei nodi di Ranvier maturi. Gli studi di Isom chiariscono come i legami tra l'anchirina-G e i canali del sodio siano mediati dalla subunità  $\beta 1$ . La localizzazione dei canali del  $\text{Na}^+$  nei nodi di Ranvier è essenziale per garantire una efficiente conduzione dei potenziali d'azione. Il reclutamento e il raggruppamento dei canali del sodio può inoltre essere facilitato dalle interazioni scoperte recentemente tra la subunità  $\beta 1$  (e  $\beta 3$ ) e la neurofascina, una proteina coinvolta sia nella formazione del nascente nodo di Ranvier che nella stabilizzazione del nodo maturo (Ratcliffe et al., 2001). La diminuzione del numero di nodi di Ranvier e il decremento nella velocità di conduzione osservata in topi  $\text{SCN1B}^{-/-}$ , potrebbero essere causati dal venir meno dell'interazione tra  $\beta 1$  e contactina, che a sua volta compromette l'interazione tra contactina e subunità  $\alpha$ , con conseguente calo nell'espressione di membrana della subunità  $\alpha$ . Questa ipotesi è supportata dalla somiglianza nei fenotipi dei topi *knock out* per  $\beta 1$  e per contactina (Chen et al., 2004). A livello ippocampale sono state inoltre osservate variazioni relative all'espressione di  $\text{Na}_v 1.1$  tra topi *knock out* e *wild type*. Infatti,  $\text{Na}_v 1.1$  appare assente in sottogruppi di neuroni piramidali CA2/CA3, in cellule granulari del foglietto esterno del giro dentato e la sua marcatura è scarsa negli interneuroni. Negli interneuroni situati in CA1-CA3 e nel giro dentato si ha invece un'aumentata espressione di  $\text{Na}_v 1.3$ , isoforma normalmente non presente nell'animale adulto.

La subunità  $\beta 2$ , di circa 33 kDa, è codificata dal gene  $\text{SCN2B}$  che mappa sul cromosoma 11q23. Il dominio extracellulare della subunità  $\beta 2$  mostra un elevato grado di identità con la contactina. Lo studio degli effetti funzionali, esercitati da  $\beta 2$  sulla subunità  $\alpha$   $\text{rNa}_v 1.2$ , condotto in oociti di *Xenopus* (Isom et al., 1995), dimostra che essa è in grado di indurre un aumento della densità di corrente, uno spostamento in direzione iperpolarizzante della curva di voltaggio dipendenza dell'inattivazione e un incremento del numero di canali



voltage dipendenti del sodio funzionanti nel “*fast gating mode*” (cioè dei canali con inattivazione rapida). In cellule di mammifero tsA201 è stato osservato invece uno spostamento in direzione depolarizzante di circa 3.6 mV della curva di voltage dipendenza dell’attivazione e di circa 8.5 mV della curva di voltage dipendenza dell’inattivazione (Qu et al., 2001).

Johnson et al. nel 2006 hanno studiato come la glicosilazione della subunità  $\beta 2$  incida sulla modulazione di due isoforme del canale voltage dipendente del sodio,  $\text{Na}_v1.5$  e  $\text{Na}_v1.2$ , utilizzando le linee cellulari Pro5, in cui i processi di glicosilazione/sialilazione sono effettuati normalmente e Lec2, deficitaria di un enzima chiave nel processo di sialilazione, e pertanto incapace di portarlo a termine. La co-espressione di  $\text{Na}_v1.5$  e  $\beta 2$  nella linea Pro5 causa uno spostamento in direzione iperpolarizzante della curva di voltage dipendenza dell’attivazione, una più veloce cinetica di inattivazione e un più veloce recupero dall’inattivazione. Se invece la co-espressione viene realizzata nella linea Lec2 non si riscontra nessun effetto della subunità  $\beta 2$ , il che sta ad indicare che gli effetti dipendono dalla presenza degli acidi salici nella proteina. Facendo co-esprimere  $\text{Na}_v1.2$  e  $\beta 2$ , invece, non si riscontra alcuna differenza negli effetti indotti dalla subunità  $\beta 2$  tra le due linee cellulari: in entrambe la subunità  $\beta 2$  è in grado di determinare uno spostamento in direzione depolarizzante delle proprietà di *gating* del canale. Quindi, gli effetti generati dalla  $\beta 2$  sull’isoforma  $\text{Na}_v1.2$  non sono dipendenti dalla presenza dei residui di acido sialico, come confermano esperimenti realizzati usando un mutante di  $\beta 2$  non sialilabile. I dati di Johnson et al. mettono in luce come la subunità  $\beta 2$  sia in grado di modulare le proprietà dei canali voltage dipendenti del sodio attraverso distinti meccanismi, correlati all’isoforma di subunità  $\alpha$  alla quale essa è associata.

Meadows et al. nel 2002, utilizzando cellule CHO come sistema di espressione, hanno visto che la coespressione della subunità  $\beta 2$  e di  $\text{hNa}_v1.3$  non modifica le proprietà di *gating* del canale.

L’uso di topi *knock out* per la subunità  $\beta 2$  (Chen et al., 2002) ha evidenziato che questa subunità, sebbene non essenziale per la sopravvivenza, condiziona la funzionalità e l’espressione dei canali voltage dipendenti del sodio. Inoltre, il suo ruolo di molecola di adesione cellulare è stato messo in luce dagli esperimenti condotti da Malhotra et al. nel 2000, che hanno dimostrato la sua capacità di stabilire interazioni omofile in trans e di associarsi ad elementi del citoscheletro, lasciando ipotizzare un possibile ruolo nella localizzazione dei canali del sodio nei nodi di Ranvier e la sua partecipazione alla formazione delle giunzioni sinaptiche durante lo sviluppo neuronale.

Kim et al. nel 2005 hanno dimostrato che la subunità  $\beta 2$  rappresenta un substrato dell'azione, in successione, di  $\alpha$  e  $\gamma$  secretasi (vedi paragrafo BACE1 e P/S  $\gamma$  secretasi).

Lopez-Santiago et al. nel 2006 hanno descritto nei piccoli neuroni DRG (neuroni nocicettivi) isolati da topi  $\beta 2^{-/-}$  una riduzione delle correnti TTX sensibili rispetto a quelle presenti nei medesimi neuroni in topi *wild type*. Questa diminuzione non è causata da un cambiamento della voltaggio dipendenza di attivazione e/o inattivazione della corrente di sodio TTX sensibile, ma piuttosto da una minore espressione delle isoforme di  $\text{Na}_v$  TTX sensibili, in particolare di  $\text{Na}_v 1.7$ . Viene quindi ribadito il ruolo esercitato da  $\beta 2$  nel regolare l'inserimento in membrana dei canali  $\text{Na}_v$  TTX sensibili.

La subunità  $\beta 3$ , codificata dal gene SCN3B che mappa sul cromosoma 11q23, possiede circa il 50% di omologia con la subunità  $\beta 1$ . Anch'essa, nella sua regione C-terminale, presenta un'omologia di sequenza del 26% con la molecola di adesione cellulare mielina  $\text{P}_0$ . La porzione C-terminale intracellulare possiede la sequenza YLA $\text{I}$ , che rappresenta il segnale di internalizzazione riconosciuto dalla clatrina, suggerendo pertanto il coinvolgimento della  $\beta 3$  nella localizzazione dei canali voltaggio dipendenti del sodio. È stata dimostrata inoltre l'esistenza di un'associazione tra la  $\beta 3$  e la neurofascina (Ratcliffe et al., 2001). Questa interazione potrebbe essere molto importante per indirizzare e stabilizzare i canali a livello dei nodi di Ranvier. La coespressione di  $\beta 3$  e  $\text{rNa}_v 1.2$  in oociti di *Xenopus* determina un incremento della frazione di canali funzionanti nel *fast gating mode*, un aumento della velocità di decadimento della corrente, una riduzione della pendenza e uno spostamento in direzione iperpolarizzante della curva di voltaggio-dipendenza dell'inattivazione (Morgan et al., 2000). Va notato però che un maggior numero di canali opera nel *fast gating mode* in presenza della  $\beta 1$  rispetto alla  $\beta 3$ . Questa differenza viene ricondotta ad una diversità strutturale localizzata negli *strands A/A'* del core idrofobico dell'*Ig-fold*, che si ritengono direttamente coinvolti nell'associazione con la subunità  $\alpha$  (McCormick et al., 1998). Stevens et al. nel 2001 hanno dimostrato che la subunità  $\beta 3$  è in grado di influenzare anche l'attività dell'isoforma  $\text{Na}_v 1.4$  del canale voltaggio dipendente del sodio. La trasfezione di cellule tsA201 con  $\beta 3$  e  $\text{rNa}_v 1.2$  ha messo in luce uno spostamento in direzione depolarizzante delle curve di voltaggio dipendenza di attivazione e inattivazione. Inoltre la subunità  $\beta 3$  causa un incremento significativo della corrente persistente e questo potrebbe tradursi in una maggiore eccitabilità (Qu et al., 2001). Infine, utilizzando costrutti tronchi della subunità  $\beta 3$  fusi con la proteina fluorescente EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) Yu et al. nel 2005 hanno scoperto che la regione extracellulare influenza le proprietà di *gating* del canale ma non è essenziale per indirizzarlo in membrana, mentre la regione intracellulare è fondamentale per la corretta espressione in membrana del canale.

La subunità  $\beta 4$  è codificata dal gene SCN4B situato, analogamente a SCN2B e SCN3B, sul cromosoma 11q24. La subunità  $\beta 4$  ha una percentuale di omologia di sequenza aminoacidica del 35% con la  $\beta 2$ , del 20-22% con la  $\beta 1$  e la  $\beta 3$ . Anch'essa è una proteina a singolo dominio transmembrana e presenta un ampio dominio N-terminale strutturato a *Ig-fold*, una breve regione transmembranaria e una corta sequenza citoplasmatica. A livello extracellulare la subunità  $\beta 4$ , come la  $\beta 2$ , possiede 5 cisteine: 4 sono impegnate nella formazione di due ponti disolfuro che stabilizzano il motivo *Ig-fold*, mentre la quinta va a formare un ponte disolfuro con la subunità  $\alpha$ . L'interazione con la subunità  $\alpha$  è stata confermata da esperimenti di co-immunoprecipitazione, condotti in cellule tsA201 trasfettate con  $\beta 4$  e rNa<sub>v</sub>1.2 (Yu et al., 2003). Lo studio degli effetti funzionali di  $\beta 4$  è stato realizzato in cellule tsA 201 trasfettate con  $\beta 4$  e rNa<sub>v</sub>1.2 o rNa<sub>v</sub>1.4 o rNa<sub>v</sub>1.5 (Yu et al., 2003). Le registrazioni elettrofisiologiche hanno evidenziato che la subunità  $\beta 4$  non ha alcun effetto sull'isoforma cardiaca di subunità  $\alpha$ , mentre è in grado di modulare l'isoforma neuronale e scheletrica, determinando uno spostamento in direzione depolarizzante della curva di voltaggio-dipendenza dell'attivazione.

Oyama et al. nel 2006, con esperimenti su un modello animale di Huntington Disease<sup>9</sup> e l'utilizzo di cellule di neuroblastoma Neuro2A, hanno dimostrato che la subunità  $\beta 4$  può agire da molecola di adesione e che svolge un ruolo importante nella crescita dei neuriti e nella formazione delle spine dendritiche. La *down*-regolazione di  $\beta 4$  nella patologia di Huntington causerebbe pertanto degenerazione dei neuriti oltre ad alterazioni funzionali dei canali voltaggio dipendenti del sodio.

La subunità  $\beta 4$ , così come la  $\beta 2$ , è substrato della proteasi BACE 1. Miyazaki et al. nel 2007 hanno dimostrato che la modulazione effettuata da BACE 1 su  $\beta 4$  può regolare la morfologia dei neuriti e la morfogenesi delle spine.

Infine, Medeiros-Domingo et al. nel 2007 hanno identificato una mutazione nel gene SCN4B associata all'insorgenza della patologia cardiaca del QT-lungo<sup>10</sup>, mettendo così in risalto l'importanza fisiopatologica che la subunità  $\beta 4$  può rivestire anche al di fuori del sistema nervoso. La mutazione, che comporta la sostituzione di una leucina con una fenilalanina ( $\beta 4$ L179F), è localizzata nella regione transmembranaria e si suppone alteri la struttura secondaria. La trasfezione del mutante in cellule HEK che esprimono stabilmente hNa<sub>v</sub>1.5

---

<sup>9</sup> Huntington Disease: patologia ereditaria che colpisce il sistema nervoso centrale. Si manifesta in età adulta con tipiche alterazioni dei movimenti e progressivo decadimento cerebrale. È causata da una forma alterata della proteina huntingtina che porta a morte neuronale in specifiche aree cerebrali.

<sup>10</sup> Sindrome del QT lungo: patologia cardiaca che consiste in un prolungamento della fase di ripolarizzazione successiva alla depolarizzazione dei ventricoli. Questa condizione può determinare sincope e morte improvvisa a causa di aritmia ventricolare. Sono state identificate mutazioni in numerosi geni associate all'insorgenza di tale patologia (LQT1-LQT10).

provoca uno spostamento in direzione depolarizzante della curva di voltaggio dipendenza dell'inattivazione rispetto alle cellule trasfettate con la subunità  $\beta 4$  *wild type*. Ne consegue pertanto un ampliamento della corrente finestra, il che può spiegare l'aumento della corrente di sodio in fase di ripolarizzazione e quindi il prolungamento dell'intervallo QT. Inoltre, al contrario di quanto descritto da Yu et al., da questi dati risulta evidente che la subunità  $\beta 4$  è in grado di modulare anche l'isoforma cardiaca del canale voltaggio dipendente del sodio.

### *p11*

p11 appartiene alla famiglia delle S100, proteine di basso peso molecolare caratterizzate da *EF-hand*, dei motivi *helix-loop-helix* che permettono il legame con ioni  $\text{Ca}^{2+}$ . Tuttavia p11 non è sensibile alle concentrazioni di  $\text{Ca}^{2+}$ , a causa della sostituzione di due aminoacidi proprio nel sito di legame per il calcio che “blocca” la proteina in uno stato di permanente attivazione. La maggior parte di proteina p11 si trova nella cellula sotto forma di eterotetramero con la proteina annexina A2<sup>11</sup> che indirizza il complesso verso specifici domini cellulari, in particolare verso *raft* lipidici<sup>12</sup> della membrana cellulare (Hayes et al., 2004). p11 interagisce anche con altre proteine, come i canali ionici 1a acido-sensibili (Donier et al., 2005), i canali  $\text{K}^+$  1 a due pori acido-sensibili (Girard et al., 2002), il recettore 1B per la serotonina (Svenningsson et al., 2006) e  $\text{Na}_v1.8$  (Okuse et al., 2002). Si ipotizza che, in associazione con l'annexina A2, p11 vada a regolare il traffico intracellulare di queste proteine verso la membrana plasmatica. Per quanto riguarda i canali voltaggio dipendenti del sodio, è stato dimostrato che p11 lega  $\text{Na}_v1.8$  al livello di un dominio posto nell'N-terminale del canale; la coespressione di queste due proteine in cellule CHO ha rivelato un'aumentata espressione del canale in membrana (Okuse et al., 2002). Infine, i neuroni sensoriali di topi  $\text{p11}^{-/-}$  mostrano un deficit di  $\text{Na}_v1.8$ , che si riflette in una diminuita densità di corrente (Foulkes et al., 2006). Ad oggi sono stati proposti due ipotetici meccanismi che potrebbero spiegare l'aumento dell'espressione di recettori/canali nella membrana plasmatica ad opera di p11. La prima ipotesi sostiene che l'interazione del complesso annexinaA2-p11 con il colesterolo e con i *raft* di lipidi ricchi di  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  aumenti la stabilità dei canali/recettori nella membrana plasmatica (Hayes et al., 2004a; Rescher et al., 2004). La seconda ipotesi prevede invece un controllo diretto di p11 sul *trafficking* del canale (Rescher and Gerke, 2008).

### *Anchirina*

Le anchirine sono una famiglia di proteine adattatrici responsabili della localizzazione di proteine associate alla membrana e di proteine citosoliche in domini di membrana

---

<sup>11</sup> Annexina A2: proteine che legano i fosfolipidi  $\text{Ca}^{2+}$ -regolate.

<sup>12</sup> *Raft* lipidici: microdomini lipidici meno fluidi rispetto alla membrana circostante (Simon e Ikonen, 1997), formati principalmente da sfingolipidi e colesterolo allo stato liquido-ordinato, che funzionerebbero sia da zattere di trasporto di componenti di membrana, sia da piattaforme per la genesi di segnali intracellulari.

specializzati. Nei vertebrati superiori anchirina-R, anchirina-B e anchirina-G sono codificate rispettivamente dai geni ANK1, ANK2 e ANK3. Lo *splicing* alternativo produce uno spettro di proteine strutturalmente e funzionalmente diverse di 26-480 kDa. Le anchirine canoniche (210 kDa anchirina-R, 220 kDa anchirina-B, 190 kDa anchirina-G) hanno quattro domini principali: un dominio N-terminale di legame per la membrana che consiste di 24 ripetizioni consecutive di un AR, *ankyrin repeat domain* (un motivo di 33 residui aminoacidici che media le interazioni proteina-proteina), un dominio di legame per la spectrina, un dominio di morte (un DD, *death domain*, implicato nella segnalazione dell'apoptosi<sup>13</sup>) e un dominio C-terminale (Mohler et al., 2002). Il dominio di legame per la membrana lega diverse proteine di membrana, tra cui i canali voltaggio-dipendenti del sodio. E' stato individuato un motivo di 9 residui nel loop che unisce DII e DIII nei canali voltaggio-dipendenti del sodio che è critico per il legame con l'anchirina-G (Lemaitre et al., 2003) ed è necessario per la localizzazione di Na<sub>v</sub>1.5 nel cuore (Garrido et al., 2003; Mohler et al., 2004). Nella membrana plasmatica ventricolare dei cardiomiociti una mutazione spontanea (E1053K) di Na<sub>v</sub>1.5 ne compromette il legame con l'anchirina-G e, di conseguenza, l'espressione del canale (Mohler et al., 2004). L'anchirina-G è inoltre responsabile della formazione di *cluster* di Na<sub>v</sub>1.2 e Na<sub>v</sub>1.6 nei nodi di Ranvier (Garrido et al., 2003; Jenkins and Bennett, 2001). Garrido et al. hanno creato una GFP chimerica fusa con il suddetto *loop* citoplasmatico di rNa<sub>v</sub>1.2 e, dopo aver trasfettato il costrutto in neuroni ippocampali di ratto, hanno osservato un'anomala localizzazione della proteina fluorescente. La GFP chimerica non risultava infatti dispersa nel citoplasma ma confinata a livello dell'AIS. Il ruolo dell'anchirina-G nel *trafficking* di altri canali voltaggio-dipendenti del sodio non è stato ancora chiarito. I dati relativi al ruolo di anchirina-B nel *trafficking* dei canali voltaggio dipendenti del sodio ottenuti fino ad oggi sono contraddittori: Lowe et al. nel 2008 hanno dimostrato che il *silencing* di anchirina-B in cardiomiociti adulti di ratto non ha alcun effetto sull'espressione dei canali voltaggio-dipendenti del sodio, mentre in cardiomiociti di topo anchirina-B<sup>-/-</sup> è stata osservata una riduzione dell'espressione di questi canali (Chauhan et al., 2000). Infine, l'interazione fra anchirina-R e canali voltaggio-dipendenti del sodio non è stata ancora studiata.

Il *targeting* di proteine alla membrana plasmatica mediato dalle anchirine potrebbe richiedere l'intervento della spectrina, una proteina citoscheletrica che si lega simultaneamente a proteine integrali di membrana, a proteine citosoliche e a fosfolipidi per creare adattatori multifunzionali. La spectrina può inoltre legare la maggior parte degli elementi citoscheletrici, connettendoli a proteine di membrana e a proteine citosoliche (De Matteis and Morrow, 2000; Kosaka et al., 2008). Infine la spectrina gioca un ruolo chiave nel

---

<sup>13</sup> Apoptosi: morte cellulare programmata.

*pathway* di secrezione, a livello dell'interfaccia ER-Golgi (Watabe et al., 2008). Un sistema anchirina-spectrina potrebbe quindi svolgere un ruolo importante nel *trafficking* dei canali voltaggio-dipendenti dal reticolo endoplasmatico al Golgi.

### *Sintrofina*

La sintrofina ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) è una proteina adattatrice che lega e localizza presso la membrana plasmatica proteine segnalatrici. La sintrofina si lega direttamente a membri della famiglia delle distrofine e può interagire simultaneamente con più proteine tramite due domini di omologia alla plestrina, un dominio PDZ<sup>14</sup> e una regione altamente conservata. Il dominio PDZ consente il legame con Na<sub>v</sub>1.4 e Na<sub>v</sub>1.5, al livello degli ultimi tre residui del loro C-terminale (SIV) (Haeneggi and Fritschy, 2006). Un motivo simile (SLV) è stato trovato anche nel C-terminale di Na<sub>v</sub>1.8. Sebbene sia stato dimostrato che la sintrofina giochi un ruolo importante per la localizzazione di Na<sub>v</sub>1.5, sono poche le evidenze che indichino un loro eventuale coinvolgimento anche nel *trafficking* verso la membrana plasmatica. Un'ipotesi è che questa proteina potrebbe stabilizzare i canali voltaggio-dipendenti del sodio in membrana e ridurre l'internalizzazione (Shao et al., 2009).

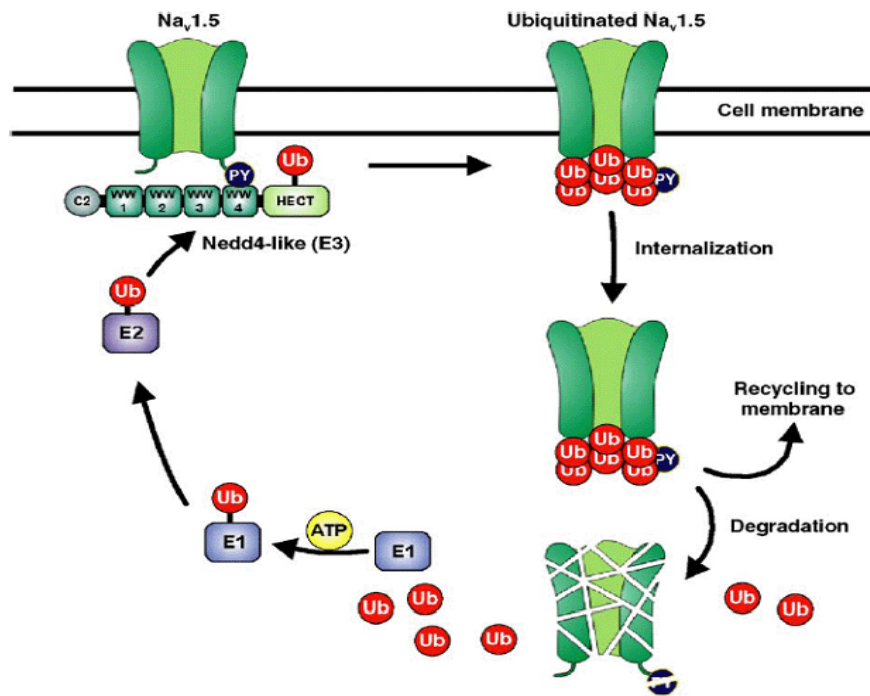
### *Nedd*

Nel genoma umano esistono almeno nove geni codificanti elementi appartenenti alla famiglia di proteine Nedd4 (*Neuronal precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4*). Tali proteine sono degli enzimi deputati alla ligazione dell'ubiquitina alle sue molecole bersaglio, processo definito appunto ubiquitinazione. L'ubiquitina è trasportata verso il suo bersaglio in successione da tre enzimi: E1, E2 ed E3 (Fig.10). Gli enzimi E3, membri di questa famiglia, sono formati da un dominio C2 coinvolto nell'indirizzamento verso la membrana plasmatica, da due fino a quattro domini WW che rappresentano i siti di interazione proteina-proteina e di riconoscimento del substrato e da un dominio catalitico HECT C-terminale, responsabile della ligazione dell'ubiquitina (Kumar et al., 1997; Shearwin-Whyatt et al., 2006). Nedd4 regola diversi processi biologici interagendo tramite i suoi domini WW con il motivo PY (all'interno della sequenza consenso xPPxY) presente sulle molecole bersaglio (Ingham et al., 2004).

I motivi WW2 e WW3 di Nedd4 e i motivi WW3 e WW4 di Nedd4-2 legano rispettivamente i motivi PY di Na<sub>v</sub>1.1 e Na<sub>v</sub>1.3 e di Na<sub>v</sub>1.5 e Na<sub>v</sub>1.8 (Fotia et al., 2004). Van Bemmelen et al. nel 2004 hanno dimostrato che l'espressione di Na<sub>v</sub>1.2, Na<sub>v</sub>1.3 e Na<sub>v</sub>1.5 viene downregolata in seguito all'ubiquitinazione mediata da Nedd4.2 e che l'espressione di Nav1.5 viene regolata anche da Nedd4-1 e da WWP2 (un'altra ubiquitina-ligasi). La

<sup>14</sup> Dominio PDZ: sono strutture modulari costituite da 6 beta-filamenti e 2 alfa-eliche che riconoscono gli amminoacidi C-terminali (almeno 4) delle proteine in modo sequenza specifico, e sono coinvolti nelle interazioni proteina-proteina delle vie di segnalazione cellulari.

modulazione della densità dei canali voltaggio dipendenti del sodio presenti sulla membrana plasmatica, operata attraverso l'azione di internalizzazione delle proteine Nedd, può quindi costituire un meccanismo di regolazione dell'eccitabilità neuronale e cardiaca.



**Fig.10: Schema che rappresenta un ipotetico modello di regolazione di  $Na_v1.5$  attraverso ubiquitinazione.** L'ubiquitina è trasportata in successione da tre enzimi: E1, E2, E3. Gli enzimi E3 (proteine Nedd) sono ubiquitina ligasi che interagiscono in maniera specifica con le proteine bersaglio. L'interazione avviene tra uno dei domini WW di E3 e il motivo PY di  $Na_v1.5$ . Le proteine ubiquitinate sono riconosciute dal sistema di internalizzazione. In seguito all'internalizzazione il canale può essere diretto verso la via degradativa o, dopo rimozione dell'ubiquitina, riciclato in membrana. (Abriel et al., 2005)

### *FHF*s

Le proteine FHF (*fibroblast growth factor homologous factors*) sono una famiglia di proteine con sequenza e struttura simile a quella dei fattori di crescita dei fibroblasti (FGFs). L'espressione dei geni codificanti per le proteine FHF inizia durante l'embriogenesi e si mantiene durante la vita adulta nel sistema nervoso centrale e periferico, suggerendone un ruolo chiave nel normale sviluppo del sistema nervoso (Goldfarb et al., 2005; Smallwood et al., 1996). Queste proteine presentano un *core* principale altamente conservato e un N- e un C-terminale meno conservati (Smallwood et al., 1996); la diversità tra i diversi membri della famiglia è aumentata ulteriormente da fenomeni di *splicing* alternativo (Goldfarb, 2005; Munoz-sanjuan et al., 2000; Smallwood et al., 1996; Wang et al., 2000). Ad esempio FGF14-1a, noto anche come FHF4, presenta un N-terminale di 64 aminoacidi che è altamente omologo a quello di FGF12-1a e FGF13-1a (46% di identità), mentre FGF14-1b, la forma più abbondantemente espressa nel sistema nervoso, ha un N-terminale di 69 aminoacidi

completamente differente (Munoz-sanjuan et al., 2000; Wang et al., 2000). E' probabile, quindi, che le differenze dell'N-terminale condizionino le funzioni di queste diverse proteine.

Diverse evidenze hanno dimostrato che le proteine FHF interagiscono direttamente con la subunità  $\alpha$  dei canali voltaggio-dipendenti del sodio tramite interazioni con la loro zona C-terminale, modulandone le proprietà di *gating* e l'espressione in membrana in maniera isoforma-specifica (Laezza et al., 2007; Li et al., 2001; Lou et al., 2005; Rush et al., 2006b; Wittmack et al., 2004). Ad esempio, la coespressione con FGF14-1b in cellule HEK provoca una diminuzione consistente delle densità di corrente di  $\text{Na}_v1.1$  e  $\text{Na}_v1.5$  e sposta la curva di voltaggio-dipendenza dell'inattivazione delle due isoforme in senso opposto; FGF14-1a invece sopprime l'espressione di  $\text{Na}_v1.5$  ma non di  $\text{Na}_v1.1$  (Lou et al., 2005). Inoltre, mentre sia FGF13-1a (FHF2A) che FGF13-1b (FHF2B) portano ad un aumento della densità di corrente di  $\text{Na}_v1.6$ , FGF13-1a e 1b aumentano ed inibiscono rispettivamente l'accumulo di canale inattivato (Rush et al., 2006); su  $\text{Na}_v1.2$  sono stati osservati effetti simili (Lampert, Dib-Hajj and Waxman, osservazioni non pubblicate).

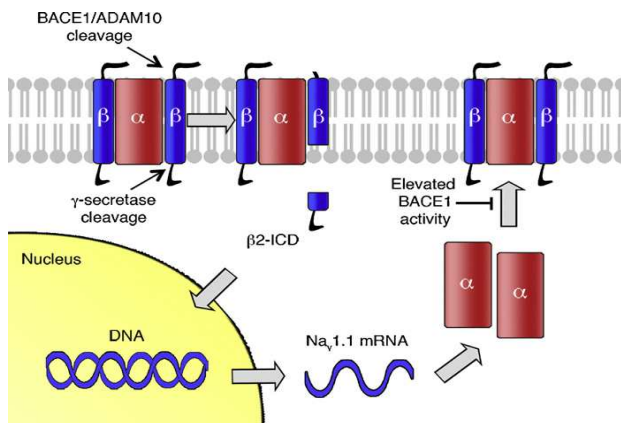
E' stato dimostrato che FGF14-1a e -1b e FGF13 localizzano nel segmento iniziale dell'assone e nei nodi di Ranvier (Goldfarb et al., 2007; Laezza et al., 2007; Rush et al., 2006b; Wittmack et al., 2004), due domini subcellulari dove sono presenti elevate quantità di  $\text{Na}_v1.2$  e di  $\text{Na}_v1.6$  (Peles et al., 2000; Poliak and Peles, 2003). L'analisi funzionale del mutante FGF14<sup>F145S</sup>, una mutazione individuata in pazienti affetti da ataxia spino cerebellare 27, suggerisce che questo mutante abbia un effetto dominante negativo su FGF14 *wild type*, inibendone l'interazione con i canali voltaggio-dipendenti del sodio. L'espressione di questo mutante in neuroni ippocampali in coltura compromette l'eccitabilità neuronale diminuendo drasticamente le correnti di sodio (Laezza et al., 2007). Inoltre, la perdita di FGF14 nei granuli cerebellari e nelle cellule del Purkinje in topi  $\text{Fgf14}^{-/-}$  ha come effetto una diminuita eccitabilità neuronale (Goldfarb et al., 2007; Shakkottai et al., 2009). Questi studi hanno messo in luce l'importanza del ruolo giocato da FGF14 nella regolazione dell'espressione di  $\text{Na}_v1.2$ ,  $\text{Na}_v1.1$  e  $\text{Na}_v1.6$ .

#### *BACE1 e P/S $\gamma$ secretasi*

BACE1 ( $\beta$ -site APP cleaving enzyme 1) è una  $\beta$  secretasi deputata al processamento della proteina APP (*Amyloid precursor protein*). La proteina APP è infatti processata in successione da  $\beta$  e  $\gamma$  secretasi, il che porta alla produzione di un frammento C-terminale associato alla membrana e di un peptide secreto  $\text{A}\beta$  (*amyloid  $\beta$  peptide*). L'accumularsi di questo peptide, associato ad un'incrementata attività di BACE1, è una delle principali cause dei fenomeni neuro-degenerativi che si riscontrano nei pazienti affetti da Alzheimer. Fino ad oggi, poche altre proteine, oltre ai membri della famiglia APP, sono state individuate come



substrato di BACE1, e tra queste si possono annoverare le subunità accessorie  $\beta$  dei canali

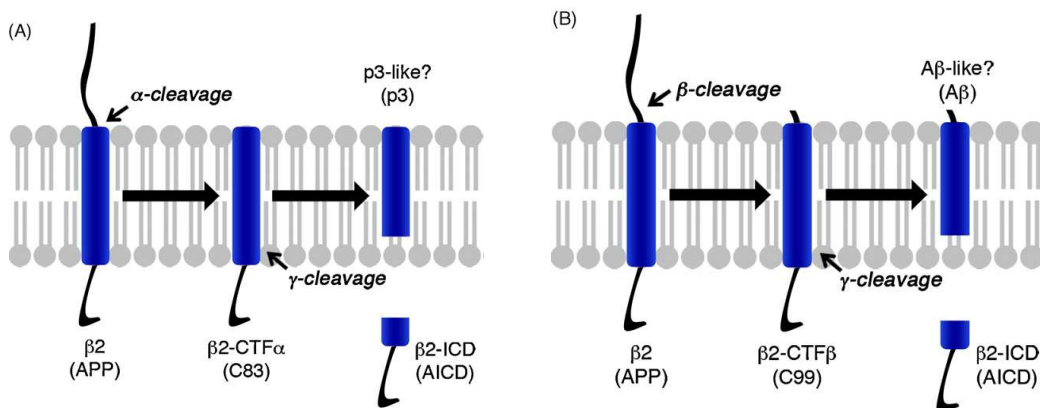


**Fig.11: Rappresentazione schematica della regolazione di  $\text{Na}_v1.1$  da parte di BACE/ADAM1 e delle  $\gamma$ -secretasi.**  $\text{Na}_v\beta$  che genera un dominio intracellulare AICD/ $\beta 2$ -ICD.  $\text{Na}_v\beta 2$  viene processato da BACE o da ADAM1. Il frammento C-terminale che ne risulta viene successivamente processato da una PS/  $\gamma$ -secretasi che genera  $\beta 2$ -ICD, un frammento che va nel nucleo dove induce un incremento del messaggero per  $\text{Na}_v1.1$ . Tuttavia, l'elevata attività di BACE1 interferisce anche col *trafficking* del canale in membrana probabilmente attraverso la deplezione di  $\beta 2$ . (Kovacs et al., 2010).

voltaggio dipendenti del sodio (Wong HK et al., 2005).

Le subunità  $\text{Na}_v\beta 2$  vengono infatti processate attraverso due distinte cascate di tagli, mediate da  $\alpha$ -/ $\gamma$ -secretasi e da  $\beta$ -/ $\gamma$ -secretasi (fig.12). Il taglio ad opera dell'  $\alpha$ -secretasi ADAM10 origina un frammento C-terminale ( $\beta 2$ -CTF $\alpha$ ) che viene poi ulteriormente processato da PS/ $\gamma$ -secretasi, generando un frammento intracellulare ( $\beta 2$ -ICD)(Fig.11A). Nel pathway  $\beta$ / $\gamma$ -secretasi  $\text{Na}_v\beta 2$  è tagliata in un primo momento da BACE1 che genera  $\beta 2$ -CTF $\alpha$ , che viene poi convertito in  $\beta 2$ -ICD da una PS/ $\gamma$ -secretasi (Fig.12B).

Non è stato ancora chiarito se il processamento mediato dalle PS/ $\gamma$ -secretasi porti o meno alla generazione di un peptide  $\alpha\beta$ -simile (Kovacs et al., 2010).



**Fig.12: Schema che rappresenta il processamento di APP e  $\text{Na}_v\beta 2$  tramite due pathways di taglio simili.** (A) Nel pathway non-amiloidogenico APP/ $\beta 2$  vengono private del dominio extracellulare da un'  $\alpha$ -secretasi e vengono successivamente processate da una PS/  $\gamma$ -secretasi che genera un dominio intracellulare AICD/ $\beta 2$ -ICD. (B) Nel pathway amiloidogenico APP/ $\beta 2$  vengono private del dominio extracellulare da BACE1, producendo un frammento C-terminale (C99/ $\beta 2$ -ICD) che viene successivamente processato da una PS/  $\gamma$ -secretasi che genera un dominio intracellulare AICD/ $\beta 2$ -ICD e il peptide amiloide  $\beta$ . (Modificato da Kovacs et al., 2010)

Mentre tutte le quattro subunità  $\beta$  vengono processate da BACE1 e dalla PS/  $\gamma$ -secretasi *in vitro*, solo  $\text{Na}_v\beta 2$  e  $\text{Na}_v\beta 4$  rappresentano un substrato per BACE1 *in vivo* nel cervello di topo (Wang et al., 2005).

Nel 2007 il gruppo di Kim et al., esprimendo il frammento  $\beta 2$ -ICD in cellule di neuroblastoma di ratto e umane, ha dimostrato che questo frammento si localizza nel nucleo e induce un aumento dei livelli messaggero di  $\text{Na}_v1.1$ . Inoltre, l'aumento e la diminuzione dei livelli di BACE1 causano rispettivamente l'aumento e la diminuzione dei livelli di mRNA di  $\text{Na}_v1.1$  nelle cellule di neuroblastoma e nelle culture primarie di neuroni (Kim et al., 2005; Kim et al., 2007). Tuttavia i livelli di aumentato messaggero non correlano con un'aumentata espressione di  $\text{Na}_v1.1$  in membrana (Fig.11). L'effetto di aumentata produzione di messaggero per  $\text{Na}_v1.1$  legata a BACE1 porta infatti ad un accumulo del suddetto canale in compartimenti positivi per HSP70<sup>15</sup> (Kim et al., 2007). Si può ipotizzare inoltre che il mancato aumento di  $\text{Na}_v1.1$  in membrana sia legato all'aumentata deplezione di  $\text{Na}_v\beta 2$ , che gioca un ruolo importante nell'espressione della subunità  $\alpha$  (Kovaks et al., 2010).

BACE1 ha effetto anche su altre isoforme della subunità  $\alpha$ . Huth et al. (2009) hanno recentemente dimostrato che nei neuroni ippocampali di topi BACE1<sup>-/-</sup> c'è un aumento significativo dei livelli di  $\text{Na}_v1.2$  in membrana. Inoltre, l'overespressione di BACE1 induce uno *shift* iperpolarizzante della curva di attivazione registrata in linee cellulari trasfettate con  $\text{Na}_v1.2$  (Huth et al., 2009).

Questi dati suggeriscono, quindi, un importante ruolo svolto da BACE1 nella regolazione dell'espressione funzionale dei canali voltaggio-dipendenti del sodio.

#### *Ca<sup>2+</sup>, calmodulina e calmodulina chinasi II Ca<sup>2+</sup>-dipendente*

Le concentrazioni intracellulari di calcio influenzano il *gating* dei canali voltaggio-dipendenti del sodio direttamente, tramite il legame del  $\text{Ca}^{2+}$  all'*EF-hand* presente nel dominio C-terminale (Wingo et al., 2004), o indirettamente, attivando complessi calmodulina/calmodulina chinasi II che vanno a legare il dominio IQ (Fig.13) nel loro C-terminale (Deschenes et al., 2002; Maltsev et al., 2008; Mori et al., 2003). Recentemente inoltre è stato visto che nelle isoforme  $\text{Na}_v1.2$ ,  $\text{Na}_v1.3$  e  $\text{Na}_v1.5$  le *EF-hand* interagiscono con il dominio IQ a valle, influenzandone l'affinità per il calcio (Lee-Know et al., 2007; Shah et al., 2006; Theoharis et al., 2008).

La calmodulina è una piccola proteina di 16.7 kDa, espressa in tutte le cellule eucariotiche, che lega il  $\text{Ca}^{2+}$ , agendo così da sensore delle concentrazioni di  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmatico. Attraverso l'interazione con i suoi *targets* e con diversi tipi di molecole segnale, quali ad esempio le chinasi  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina-dipendenti, la calmodulina traduce in una risposta biologica le variazioni di concentrazione di  $\text{Ca}^{2+}$ . Tra i bersagli della calmodulina vi sono recettori, attivatori trascrizionali ed anche canali ionici. La calmodulina può indurre

<sup>15</sup> HSP70: *heat shock protein 70*, sono chaperon molecolari che gioca un ruolo nel *folding* di numerose proteine coinvolte in diversi *pathways* cellulari.

un cambiamento nella molecola bersaglio attraverso il suo semplice legame, anche indipendentemente dai cambiamenti nelle concentrazioni di  $\text{Ca}^{2+}$ . La possibilità che la calmodulina modulasse l'attività dei canali voltaggio dipendenti del sodio fu messa in luce attraverso il “sistema dei due ibridi”, che dimostrò l'esistenza di un'interazione tra il motivo IQ, costituito dalla sequenza consenso IQXXXRGXXXR (fig.13), presente sul C-terminale di tutte le subunità  $\alpha$  dei canali voltaggio dipendenti del  $\text{Na}^+$  e la calmodulina stessa (Mori et al., 2003). Herzog et al. nel 2003, studiando il legame della calmodulina con esperimenti di co-immunoprecipitazione, hanno osservato differenze nella forza di interazione tra la calmodulina e le diverse isoforme di  $\text{Na}_v$ : un legame più forte nel caso di  $\text{Na}_v1.2$ ,  $\text{Na}_v1.4$  e di  $\text{Na}_v1.6$ , un legame più debole nel caso di  $\text{Na}_v1.1$  e di  $\text{Na}_v1.3$  e mancanza di interazione per le isoforme TTX resistenti, cioè  $\text{Na}_v1.5$ ,  $\text{Na}_v1.8$  e  $\text{Na}_v1.9$ .

Deschenes et al. nel 2002, co-trasfettando cellule HEK con l'isoforma muscolare del canale voltaggio dipendente del  $\text{Na}^+$  ( $\text{Na}_v1.4$ ) e la calmodulina, hanno identificato uno spostamento iperpolarizzante nella curva della voltaggio dipendenza dell'inattivazione. Tale spostamento scompare nel caso in cui ad essere co-trasfettata sia una calmodulina mutata che non lega  $\text{Ca}^{2+}$  o in presenza di chelanti del  $\text{Ca}^{2+}$ , indicando quindi che questo effetto della calmodulina sul *gating* del canale è dipendente dalla presenza di  $\text{Ca}^{2+}$ . La calmodulina sembra invece non esercitare alcun effetto diretto sull'isoforma cardiaca del canale voltaggio dipendente del  $\text{Na}^+$  ( $\text{Na}_v1.5$ ). Il blocco delle CaM chinasi II, attraverso lo specifico inibitore KN93, invece causa un'accelerazione nel recupero dall'inattivazione veloce.

Herzog et al. nel 2003 non sono riusciti a riprodurre i risultati riportati da Deschenes et al. pur mettendosi nelle medesime condizioni di lavoro. Herzog et al. infatti non hanno osservato alcun cambiamento nella voltaggio dipendenza di  $\text{Na}_v1.4$  in presenza di CaM. L'overespressione di CaM piuttosto sembra determinare un aumento nell'ampiezza delle correnti dei canali  $\text{Na}_v1.4$  e  $\text{Na}_v1.6$  che presentano mutazioni nel motivo IQ (sostituito dal motivo IA o IE) che ne riducono l'affinità per la calmodulina. Tali mutanti, se espressi in assenza di CaM, possiedono una quantità di corrente nettamente inferiore. Il parziale ripristino funzionale, indotto dall'overespressione di CaM, suggerisce come la calmodulina possa modulare la densità di corrente attraverso interazione con il C-terminale. Un ulteriore effetto descritto da questo gruppo consiste in un rallentamento  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina dipendente della cinetica di inattivazione di  $\text{Na}_v1.6$ , il che forse può rivelarsi importante per il prolungamento della durata dei potenziali d'azione.

Young et al. nel 2005 hanno adottato sia cellule HEK che cellule CHO come sistemi eterologhi per lo studio degli effetti della CaM sui canali  $\text{Na}_v1.4$  e  $\text{Na}_v1.5$ , ottenendo dei risultati discordanti. La co-trasfezione di  $\text{Na}_v1.4$  e CaM nelle CHO provoca uno spostamento

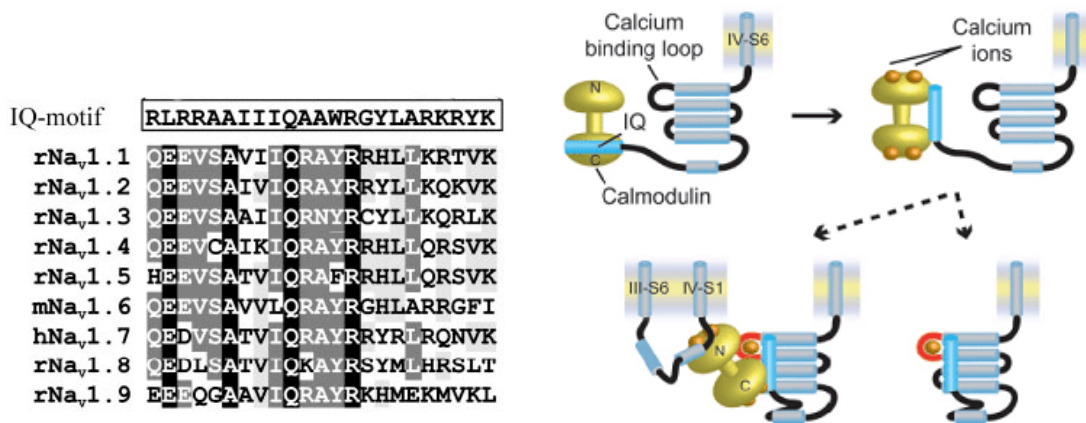
delle curve di voltaggio dipendenza di attivazione e inattivazione, effetto che invece non è visibile nelle HEK. Gli autori ipotizzano che alla base di questo diverso effetto vi sia la differente espressione delle subunità modulatorie  $\beta$  nelle due linee: nelle CHO non vi è espressione di  $\beta 4$ , nelle HEK non vi è espressione di  $\beta 1$ . Se si trasfetta la subunità accessoria  $\beta 1$  nelle HEK comunque lo spostamento delle curve di voltaggio dipendenza non si manifesta; da cui se ne deduce che probabilmente è l'espressione di  $\beta 4$  a bloccare l'effetto.

I risultati di Young et al. mostrano come la modulazione da calmodulina di  $\text{Na}_v 1.4$ , o precisamente lo spostamento depolarizzante della curva di voltaggio dipendenza dell'inattivazione sia utile per mantenere aperto un numero adeguato di canali per sostenere l'eccitabilità elettrica nella fibra muscolare.

Per quanto riguarda gli effetti della calmodulina sul canale  $\text{Na}_v 1.5$ , l'azione della CaM non sembra essere diretta ma mediata dalle CaM chinasi II. Infatti la somministrazione dell'inibitore KN93 blocca lo spostamento della voltaggio-dipendenza osservato in presenza di CaM; però, al contrario di quanto mostrato da Deschenes et al. 2002, ad essere bloccato sarebbe uno spostamento iperpolarizzante della voltaggio dipendenza dell'attivazione.

Shah et al. nel 2006 hanno elaborato un ipotetico modello di interazione tra la calmodulina e il motivo IQ dei canali voltaggio dipendenti del sodio (fig. 13). La porzione C-terminale della Apo CaM (ossia senza  $\text{Ca}^{2+}$  legato) è legata al motivo IQ del canale. In seguito all'aumento della concentrazione intracellulare di  $\text{Ca}^{2+}$ , il  $\text{Ca}^{2+}$  a sua volta si lega alla calmodulina e questo induce un cambiamento conformazionale nella calmodulina che indebolisce la sua interazione con il motivo IQ. A questo punto sono due i possibili fenomeni che si verificano: 1) la CaM si distacca dal motivo IQ, il quale va ad interagire con il motivo “*EF hand*” e si ha un legame diretto del  $\text{Ca}^{2+}$  da parte del canale oppure 2) la calmodulina, distaccandosi parzialmente dal motivo IQ, stabilisce interazioni con altre regioni del canale, tra cui per esempio il *linker* citosolico SIII-SIV.

Recenti evidenze lasciano ipotizzare inoltre che l'interazione dei canali voltaggio-dipendenti del sodio con certe proteine  $\text{Ca}^{2+}$ -attivate ne moduli anche l'espressione in membrana. Ad esempio, l'aumento dei livelli di calcio nelle cellule cromaffini della ghiandola surrenale riduce l'espressione funzionale di  $\text{Na}_v 1.7$ ; questo fenomeno è associato all'azione di  $\text{PKC}\alpha$ , calpaina (una proteasi attivata dal calcio) e calcineurina (una fosfatasi 2B  $\text{Ca}^{2+}$ /CAM-dipendente) (Wada et al., 2004).



**Fig.13:** (sinistra) Allineamento del motivo IQ nella regione C-terminale dei canali voltaggio dipendenti del sodio. I residui identici o altamente conservati sono evidenziati rispettivamente in nero o grigio. (Herzog et al., 2003) (destra) **Modello di interazione tra la calmodulina e il motivo IQ.** A livelli basali di  $\text{Ca}^{2+}$ , la calmodulina (manubrio giallo) è associata attraverso il suo lobo C-terminale al motivo IQ (cilindro blu). Il legame del  $\text{Ca}^{2+}$  alla calmodulina indebolisce l'interazione calmodulina/motivo IQ. Si possono quindi verificare due situazioni: 1) la calmodulina si distacca completamente e il motivo IQ va ad interagire con il motivo *EF-Hand* presente nella sequenza del canale, aumentandone l'affinità per il  $\text{Ca}^{2+}$  che, quindi, ad esso si lega; 2) un'estremità della calmodulina resta associata al motivo IQ, mentre l'altra estremità prende contatto con un altro partner, che potrebbe essere costituito dal *linker* citoplasmatico tra il dominio III e il dominio IV. (Shah et al., 2006).

#### *Proteine chinasi/fosfatasi*

I processi di fosforilazione/defosforilazione, che vedono coinvolti diversi tipi di chinasi (PKA, PKC, TK), interessano i *loops* intracellulari.

La PKA agisce principalmente su quattro siti localizzati nel loop tra il dominio I e II (Murphy et al., 1993). In Na<sub>v</sub>1.5 i siti di fosforilazione per la PKA sono sovrapposti con il motivo di ritenzione nel reticolo endoplasmatico; la fosforilazione di questi siti può mascherare questo motivo e portare ad un'aumentata espressione di Na<sub>v</sub>1.5 in membrana (Zhou et al., 2002). L'attivazione della PKA causa un aumento del picco di corrente generato da Na<sub>v</sub>1.8 e uno *shift* della voltaggio-dipendenza di attivazione ed inattivazione (Vijayaragavan et al., 2004). Al contrario, l'attivazione di PKA porta ad una riduzione dei picchi di corrente di Na<sub>v</sub>1.1 e Na<sub>v</sub>1.7, senza variarne le proprietà biofisiche, e di Na<sub>v</sub>1.2, agendo sulla sua inattivazione lenta (Carr et al., 2003; Chen et al., 2006). Ad oggi non è ancora stata fatta luce sul possibile coinvolgimento di PKA nel *trafficking* dei canali voltaggio-dipendenti del sodio.

La PKC, attivata direttamente dai diacilgliceroli o attraverso l'azione dell'acetilcolina sul recettore muscarinico, rallenta leggermente l'inattivazione veloce e riduce il picco di corrente (Sigel and Baur, 1988; Lotan et al., 1990; Numann et al., 1991; Cantrell et al., 1996). Il rallentamento dell'inattivazione dipende dalla fosforilazione di un sito sul *loop* intracellulare tra dominio III e IV responsabile dell'inattivazione (West et al., 1991), mentre la diminuzione del picco è dovuta alla fosforilazione dei medesimi residui *target* della PKA

(Cantrell et al., 2001). È probabile che tali processi neuromodulatori servano a modulare finemente l'eccitabilità complessiva in risposta a variazioni nell'attività sinaptica.

L'attivazione dei recettori tirosin chinasi nelle cellule P12 causa uno spostamento in direzione negativa della voltaggio dipendenza dell'inattivazione (Hilborn et al., 1998). Inoltre i canali del sodio possono anche legare la tirosin-fosfatasi di membrana RPTP $\beta$ , attraverso interazioni con la subunità  $\alpha$  e  $\beta$ 1, e cio' inibisce l'effetto della TK, determinando uno spostamento in direzione positiva della voltaggio dipendenza dell'inattivazione (Ratcliffe et al., 2000). L'azione contrapposta di TK e RPTP $\beta$  sembra essere implicata poi nel definire le interazioni tra la subunità  $\beta$ 1 e elementi della matrice extracellulare, il che concorre alla formazione di domini specializzati contenenti alte concentrazioni di canale del Na<sup>+</sup> (Ratcliffe et al., 2000). Anh et al. nel 2007 hanno identificato la famiglia di tirosin-chinasi implicata in questo tipo di modulazione: le Fyn chinasi. Gli autori hanno dimostrato l'esistenza di un'interazione tra Fyn chinasi e canali voltaggio dipendenti del sodio, isolati da cervello di ratto o co-espressi in cellule tsA201. L'associazione delle Fyn chinasi avviene in corrispondenza di un motivo SH3 presente nell'ansa intracellulare tra i domini II e III della subunità  $\alpha$  di rNa<sub>v</sub>1.2 (Beacham et al., 2007). Attraverso esperimenti di immuno-citochimica Anh et al. (2007) hanno poi evidenziato la co-localizzazione tra rNa<sub>v</sub>1.2 e Fyn chinasi sia in cellule tsA201 sia in neuroni di diversa origine (ippocampali, cerebellari, ecc.). L'effetto funzionale esercitato da queste chinasi è stato valutato mediante registrazioni elettrofisiologiche di *voltage clamp* in configurazione *whole cell* su cellule tsA201 trasfettate con rNa<sub>v</sub>1.2 in assenza o in presenza di Fyn chinasi. La co-espressione di Fyn chinasi provoca un'accelerazione dell'inattivazione veloce e uno spostamento in direzione iperpolarizzante della curva di voltaggio dipendenza dell'inattivazione; modificazioni che determinano dunque una riduzione dell'eccitabilità. L'azione bilanciata di Fyn chinasi e tirosin fosfatasi di membrana RPTP $\beta$ , che esercitano degli effetti diametralmente opposti, concorre a modulare finemente l'attività dei canali voltaggio dipendenti del sodio e tale regolazione è di fondamentale importanza per il controllo dell'eccitabilità neuronale.

### *Proteine G*

Le proteine G (*guanine nucleotide binding proteins*) sono implicate nelle cascate di trasduzione del segnale. Le "*large G protein*" sono proteine eterotrimeriche (3 subunità:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), attivate da recettori di membrana e associate alla superficie intracellulare della membrana plasmatica. Il legame della molecola segnale da parte del recettore di membrana induce in esso un cambiamento conformazionale che smaschera i siti di interazione con le proteine G, che a loro volta si attivano. La subunità  $\alpha$ , idrolizzato il GTP, si distacca dal complesso  $\beta\gamma$  ed

entrambi ( $\alpha$  e  $\beta\gamma$ ) procedono ad attivare i rispettivi effettori. L'idrolisi del GTP da parte della subunità  $\alpha$  rappresenta il segnale di terminazione e conduce alla riassociazione del complesso trimerico. Tra gli effettori delle subunità  $G\beta\gamma$  si possono annoverare i canali del  $K^+$  rettificanti entranti (Takao et al., 1994; Huang et al., 1995; Kunkel and Peralta, 1995), i canali voltaggio dipendenti del  $Ca^{2+}$  (Herlitze et al., 1996; Ikeda, 1996) ed anche quelli del  $Na^+$ .

Ma et al. nel 1997, utilizzando neuroni ippocampali dissociati o cellule CNaIIA1 (CHO che esprimono  $rNa_v1.2$ ) o cellule tsA201 trasfettate con  $rNa_v1.2$ , osservarono che l'attivazione delle proteine G, mediante somministrazione di GTP, causava uno spostamento iperpolarizzante delle curve di voltaggio dipendenza di attivazione e inattivazione della corrente di  $Na^+$ . Inoltre la co-espressione nelle tsA201 di  $rNa_v1.2$  e  $G\beta_2\gamma_3$  determinava un considerevole aumento della frazione di corrente persistente. Quest'ultimo fenomeno non aveva luogo se si faceva esprimere anche la subunità  $G\alpha$ , il che stava ad indicare che l'incremento nella persistente avveniva solo in caso di eccesso di subunità  $G\beta\gamma$  libere e la possibile spiegazione era un cambiamento nella modalità di funzionamento dei canali dal *fast gating mode* (con inattivazione rapida) allo *slow gating mode* (con attivazione ma soprattutto inattivazione rallentata e inattivazione spostata verso potenziali più positivi).

Una putativa sequenza consenso per il legame delle subunità  $G\beta\gamma$  (Gln-X-X-Glu-Arg) si trova localizzata nel C-terminale di  $rNa_v1.2$  (residui 1878-1882). L'aggiunta, alle cellule trasfettate con  $rNa_v1.2$  e  $G\beta_2\gamma_3$ , di un peptide contenente tale sequenza bloccava gli effetti precedentemente descritti, probabilmente sequestrando le subunità  $G\beta\gamma$  e impedendo così l'interazione con l'estremità del canale. In realtà esperimenti successivi (Mantegazza et al., 2005) hanno messo in evidenza come la sequenza Gln-X-X-Glu-Arg non sia necessaria per la modulazione. Infatti mutanti di  $rNa_v1.2$  in cui la porzione C-terminale è sostituita da quella di  $rNa_v1.4$ , che non possiede il suddetto motivo, risultano comunque soggetti a modulazione da parte delle subunità  $G\beta\gamma$ . Attraverso la creazione di costrutti tronchi, Mantegazza et al. nel 2005 hanno dimostrato che, ai fini di conservare la modulazione operata dalle subunità  $G\beta\gamma$ , occorrono gli ultimi 28 aminoacidi del C-terminale di  $rNa_v1.2$ . L'aumento di corrente persistente, indotto da  $G\beta\gamma$ , è stato riscontrato anche in cellule HEK stabilmente trasfettate con  $hNa_v1.1$  (Mantegazza et al., 2005).

#### Probabili proteine interagenti

##### *Papina*

La papina (*plakophilin-related armadillo-repeat protein-interacting-protein*), è una proteina di 2766 aminoacidi che presenta quattro domini PDZ all'N-terminale e due al C-

terminale (Chaib et al., 2001; Deguchi et al., 2000). I canali voltaggio-dipendenti del sodio, in particolare Na<sub>v</sub>1.1, Na<sub>v</sub>1.3 e Na<sub>v</sub>1.7, presentano diversi motivi per il legame di domini PDZ nel *loop* che unisce DII-DIII; solo Na<sub>v</sub>1.4, che presenta delle differenze significative al livello di questo *loop*, probabilmente non è in grado di legare la papaina. L'elevata quantità di domini PDZ lascia pensare che la papaina sia una proteina adattatrice e che possa rivestire un ruolo importante nella localizzazione/ritenzione al livello della membrana e nel *trafficking*/internalizzazione dei canali voltaggio-dipendenti del sodio. Potenzialmente, questi canali potrebbero legarsi ad altre proteine contenenti domini PDZ (come PSD95<sup>16</sup> o NHERF<sup>17</sup>) che potrebbero modulare l'attacco a proteine ERM<sup>18</sup> e la modulazione ad opera di proteine chinasi come PKA (Gatto et al., 2003; Horne and Dell'acqua, 2007).

#### *Proteine ERM*

Le proteine della famiglia ERM, composta da ezrina, radixin e moesina, sono coinvolte nella motilità e nel mantenimento della morfologia cellulare. Queste proteine interagiscono direttamente con i filamenti di actina, fornendo un *link* regolatorio tra citoscheletro e membrana (Louvet-Vallee et al., 2000). Nello stato inattivo le proteine ERM mostrano uno stato di autoinibizione tra N- e C-terminale; il legame con PI(4,5)P<sub>2</sub> e la fosforilazione di un residuo di treonina altamente conservato situato nel C-terminale provocano un cambiamento conformazionale che attiva la proteina, portando all'esposizione dei siti di legami all'N-terminale deputati per il legame con proteine adattatrici e di membrana, tra cui i canali voltaggio-dipendenti del sodio (Ivetic and Ridley, 2004; Louvet-Vallee, 2000). Queste proteine hanno il compito di facilitare il traffico intracellulare, il *clustering* e l'espressione polarizzata di proteine della membrana cellulare (Naren et al., 2003). E' possibile che possano svolgere un simile ruolo nell'espressione dei canali voltaggio-dipendenti del sodio (Dowling et al., 2007; Giannelli et al., 2001).

### **Canali del sodio, epilessia ed altri disordini neurologici**

I canali ionici giocano un ruolo chiave nell'epilettogenesi e nella generazione di scariche neuronali eccessive e sincrone, caratteristiche dello stato epilettico. Le scariche neuronali epilettiformi, infatti, possono essere indotte con modificazioni spontanee o

---

<sup>16</sup> PSD95: è una proteina PDZ neuronale che si associa con recettori ed elementi citoscheletrici principalmente al livello delle sinapsi.

<sup>17</sup> NHERF: proteina adattatrice coinvolta nell'ancoraggio di canali ionici e recettori al citoscheletro di actina.

<sup>18</sup> ERM: ezrina, radixin e meosina, proteine che contengono un dominio che gli permette di interagire con proteine integrali di membrana, un dominio  $\alpha$ -elica e un dominio C-terminale per l'interazione con la F-actina.



sperimentali delle proprietà dei canali ionici voltaggio-dipendenti o recettore-attivati, che portano ad alterazioni dell'eccitabilità neuronale o della trasmissione sinaptica (Avanzini and Franceschetti, 2003). Recentemente l'importanza dei canali ionici nel processo di epilettogenesi è stata confermata dalla scoperta che mutazioni a carico dei loro geni causano l'epilessia geneticamente determinata (Avanzini et al., 2007; Helbig et al., 2008; Reid et al., 2009).

La prima evidenza che i disordini neurologici dell'eccitabilità siano causati da mutazioni di geni codificanti per canali ionici viene dall'individuazione di una mutazione di SCN4A che causa una patologia del muscolo scheletrico, caratterizzata da paralisi periodiche iperkaliemiche (Ptacek et al., 1991). La lista delle canalopatie (Ptacek, 1997) include disordini dell'eccitabilità come l'emivrosia emiplegica<sup>19</sup>, le atassie episodiche<sup>20</sup>, le miotonie<sup>21</sup>, l'ipereccitabilità<sup>22</sup> e sindromi cardiache (Fig.14) (Kass, 2005; Ashcroft, 2006; Kullmann, 2010). Il presentarsi in acuto e transiente dei sintomi in individui che altrimenti sembrerebbero normali è una caratteristica comune di queste patologie e delle epilessie idiopatiche. A pochi anni dalla scoperta della mutazione di SCN4A che causa paralisi iperkaliemiche periodiche, venne individuata la prima mutazione epilettogena di un canale ionico, nella subunità  $\alpha 4$  del recettore neuronale per l'acetilcolina, in pazienti affetti da ADNFLE<sup>23</sup> (*autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy*) (Steinlein et al., 1995). Successivamente sono state individuate molte altre mutazioni e varianti genetiche dei geni codificanti per i canali ionici che causano diverse forme di epilessia (Noebels, 2003; Avanzini et al., 2007; Helbig et al., 2003; Reid et al., 2009; Kullmann et al., 2010). Una crescente mole di dati in letteratura indica che anomalie nell'espressione o nella funzionalità dei canali voltaggio-dipendenti del sodio possono giocare un ruolo fondamentale nella patofisiologia di epilessie ereditarie ed acquisite. Livelli alterati delle concentrazioni di messaggero e di proteina delle subunità  $\alpha$  Na<sub>v</sub>1.1, Na<sub>v</sub>1.2, Na<sub>v</sub>1.3 e Na<sub>v</sub>1.6 e  $\beta$  è stato riportato in modelli animali (Aronica et al., 2001; Klein et al., 2004; Blumenfeld et al., 2009; Ketelaars et al., 2001) e in tessuto umano di cervello (Whitaker et al., 2001) nelle epilessie acquisite.

Questa espressione anomala potrebbe essere coinvolta nei processi di epilettogenesi o nel mantenimento dello stato epilettico. Inoltre, un significativo incremento della corrente di

---

<sup>19</sup> Emivrosia emiplegica: L'emivrosia emiplegica è una varietà rara dell'emivrosia con aura, e può essere familiare (quando c'è una storia familiare) o sporadica.

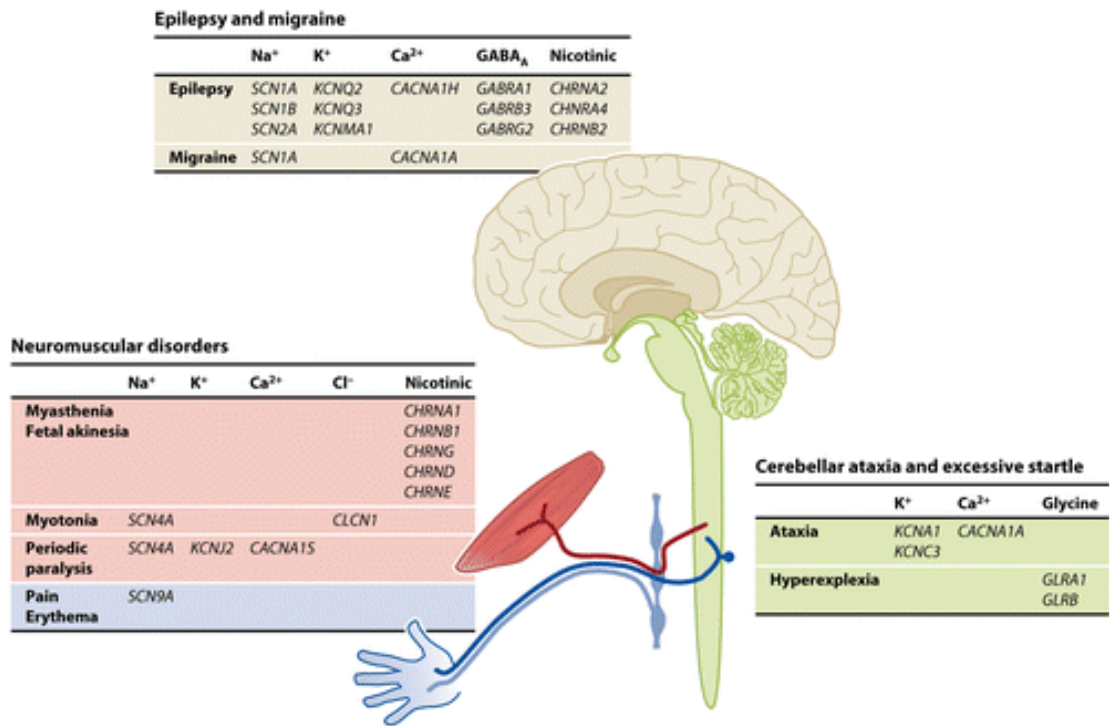
<sup>20</sup> Atassia episodica: è una forma rara di atassia ereditaria caratterizzata da attacchi sporadici di perdita della coordinazione muscolare, che possono essere accompagnati o meno da mioclonie (movimenti continui del muscolo).

<sup>21</sup> Miotonie: Malattie del sistema muscolare caratterizzate da un anormale ritardo nel rilasciamento dei muscoli volontari.

<sup>22</sup> Ipereccitabilità: disordine neurologico caratterizzato da pronunciate risposte *startle* (risposte a stimoli improvvisi ed inaspettati) a stimoli tattili e acustici e da ipertonie.

<sup>23</sup> ADNFLE: è una forma piuttosto rara di epilessia caratterizzata da frequenti e violente crisi durante il sonno.

sodio persistente (2-5 volte rispetto ai normali livelli) è stato osservato in un modello di TLE<sup>24</sup> (*temporal lobe epilepsy*) e in neuroni ottenuti dal lobo temporale di pazienti affetti da epilessia (Blumenfeld et al., 2009; Agrawal et al., 2003; Vreugdenhil et al., 2004). I dati ottenuti tramite l'utilizzo di topi transgenici che esprimono un'isoforma mutante di Na<sub>v</sub>1.2, incapace di inattivarsi completamente, indicano che un aumento della corrente persistente è sufficiente a causare crisi epilettiche croniche (Kearney et al., 2001).



**Fig. 14: Disordini dell'eccitabilità** (Kullmann et al., 2010)

L'importanza del ruolo giocato dai canali voltaggio-dipendenti del sodio nell'epilettogenesi è confermata dall'individuazione di centinaia di mutazioni epilettogene a carico di questi canali (Meisler and Kearney, 2005; Mulley et al., 2005; Harkin et al., 2007; Avanzini et al., 2007). Le sindromi epilettiche legate a mutazioni dei canali voltaggio-dipendenti del sodio possono variare molto nel loro grado di gravità, andando da disordini relativamente lievi come BFNIS (*benign familial neonatal-infantile seizures*) (Berkovic et al., 2004; Scalmani et al., 2006), FS (*febrile seizures*) (Mantegazza et al., 2005) e GEFS+ (*genetic epilepsy with febrile seizures plus*) (Scheffer and Berkovic, 1997) a encefalopatie epilettiche molto gravi come la sindrome di Dravet (o SMEI, *severe myoclonic epilepsy of infancy*) (Dravet et al., 2005; Claes et al., 2001).

<sup>24</sup> TLE: è la forma più comune fra le forme di epilessia adulta che coinvolge le strutture limbiche del lobo temporale, inclusa la corteccia entorinale (EC).

Sebbene alcune mutazioni epilettogene dei canali voltaggio-dipendenti del sodio siano state individuate nei geni che codificano per Na<sub>v</sub>1.2 (Meisler et al., 2005; Berkovic et al., 2004; Scalmani et al., 2006), per la subunità ausiliaria  $\beta$ 1 (Meisler et al., 2005; Scheffer et al., 2007; Xu et al., 2007; Patino et al., 2009), per Na<sub>v</sub>1.7 (Singh et al., 2009) e Na<sub>v</sub>1.3 (Holland et al., 2008), il *target* di mutazioni epilettogene più frequentemente colpito è rappresentato dall'isoforma Na<sub>v</sub>1.1. (Meisler and Kearney, 2005; Mulley et al., 2005; Harkin et al., 2007; Avanzini et al., 2007).

Le mutazioni a carico di Na<sub>v</sub>1.1 che causano GEFS+ sono missenso<sup>25</sup>, mentre quelle che causano SMEI possono essere sia missenso che nonsenso<sup>26</sup>, mutazioni che portano alla produzione di una proteina tronca non funzionale. Le mutazioni sono distribuite uniformemente lungo tutta la subunità  $\alpha$ , senza accumularsi in particolari *hot spots* o in particolari domini. L'espressione eterologa delle mutazioni missenso in alcuni casi ha rivelato una *gain of function* del canale, che è spesso legata ad una compromissione dell'inattivazione o ad un aumento della corrente di sodio persistente (Lossin, 2009; George, 2005). Tuttavia diverse evidenze indicano che il meccanismo principale con cui mutazioni dell'isoforma Na<sub>v</sub>1.1 causano epilessia è la *loss of function*. Infatti, più della metà delle mutazioni SMEI identificate porta alla produzione di un canale non funzionale (Meisler and Kearney, 2005; Mulley et al., 2005; Harkin et al., 2007; Avanzini et al., 2007) e la maggior parte delle mutazioni missenso studiate portano ad una ridotta corrente di sodio (Rasgdale, 2008). Inoltre, i dati recentemente ottenuti con l'utilizzo di topi transgenici indicano che il mutante GEFS+ Na<sub>v</sub>1.1R1648H, che in sistemi eterologhi sembrava causare una *gain of function* (Spampanato et al., 2001; Lossin et al., 2002), nei neuroni corticali produce una *loss of function* e che quindi l'effetto funzionale delle mutazioni è strettamente legata al sottotipo neuronale nel quale il mutante viene espresso (Tang et al., 2009).

Infine, recentemente sono stati scoperti dei mutanti la cui *loss of function* è legata a difetti di *folding*<sup>27</sup> del canale; la funzionalità di questi mutanti può essere ripristinata dalle interazioni con proteine accessorie o con bloccanti dei canali voltaggio-dipendenti del sodio, e gli effetti di questo *rescue* potrebbero anche essere cellula-tessuto specifico (Rusconi et al., 2007; Rusconi et al., 2009). Le mutazioni M1841T ed R1916G sembrano infatti compromettere il raggiungimento della struttura nativa del canale, che viene quindi riconosciuto come non correttamente strutturato e trattenuto dal sistema di controllo qualità del reticolo

---

<sup>25</sup> Mutazione missenso: quando un codone viene sostituito con uno che codifica un altro.

<sup>26</sup> Mutazione nonsenso: quando la mutazione determina la formazione di un codone di stop all'interno della sequenza

<sup>27</sup> *Folding*: processo fisico attraverso il quale un polipeptide si ripiega per assumere la struttura tridimensionale caratteristica e funzionale.

endoplasmatico e successivamente degradato. Il mancato raggiungimento della membrana plasmatica spiega dunque la perdita di funzione osservata in cellule tsA201 trasfettate con il canale mutante.

Il fatto che mutazioni *loss of function* dei canali del sodio causino epilessia, un disordine caratterizzato da ipereccitabilità, potrebbe sembrare piuttosto contraddittorio; tuttavia i dati ottenuti utilizzando due modelli murini di SMEI, *knock out* e *knock in* (mutazione Arg1407X) per SCN1A, indicano che Na<sub>v</sub>1.1 è l'isoforma prevalentemente espressa in alcuni tipi di interneuroni inibitori e che quindi l'elevata ipereccitabilità osservata nell'epilessia potrebbe essere il risultato della diminuzione del tono GABAergico inibitorio (Yu et al., 2006; Ogiwara et al., 2007).

### BFNIS

Le convulsioni familiari benigne neonatali infantili sono una patologia a trasmissione autosomica dominante caratterizzata da *cluster* di crisi parziali non-febbrili che insorgono tra due giorni e i sette mesi di età (Kaplan and Lacey, 1893)(Tab. 2). Questi *cluster* di crisi possono durare per uno o più giorni, possono evolvere a secondariamente generalizzate<sup>28</sup> e si manifestano inizialmente con sintomi focali quali deviazione degli occhi o del capo, apnea, fissità. Le crisi scompaiono dopo i 12 mesi di età e i pazienti non presentano un deficit neurologico. Altre due patologie sono strettamente correlate alla BFNIS: le convulsioni familiari benigne neonatali (BFNS), in cui le crisi avvengono nei primi giorni di vita, e le convulsioni familiari benigne infantili (BFIS), in cui le crisi cominciano a verificarsi verso i sei mesi di età. La BFNS è legata a mutazioni nei geni che codificano per i canali del potassio KCNQ2 e KCNQ3 (Singh et al., 1998); ad oggi sono state identificate circa 70 mutazioni in KCNQ2, 6 in KCNQ3 (*Human Gene Mutation Database*, Soldovieri et al., 2007). I geni che causano la BFIS invece sono ancora sconosciuti, sebbene nelle regioni 19q12-q13.11 e 16p12-q12 siano stati individuati dei locus genici legati a questa patologia (Caraballo et al., 2001; Callenbach et al., 2005).

---

<sup>28</sup> Crisi secondariamente generalizzate: si verificano quando l'aumentata eccitabilità, che inizialmente interessa un piccolo gruppo di neuroni (focolaio della crisi), si estende a tutto il mantello cerebrale comportando così la perdita di coscienza. Si distinguono dalle crisi primitivamente generalizzate in quanto queste ultime non sono precedute da crisi parziali ma interessano, fin dall'insorgenza, entrambi gli emisferi.

## Benign familial neonatal-infantile seizure

---

Family history of seizures (autosomal dominant trait)  
Normal development before onset  
No underlying disorders nor neurological abnormalities  
Onset between 2 days and 7 months of age  
Frequency ranging from few attacks to clusters  
Afebrile secondarily generalized partial seizures  
Ictal EEG: onset in the posterior areas  
Remission within 12 months  
Benign course

---

**Tab. 2: Caratteristiche cliniche della BFNIS.** (Specchio and Vigeveno 2005)

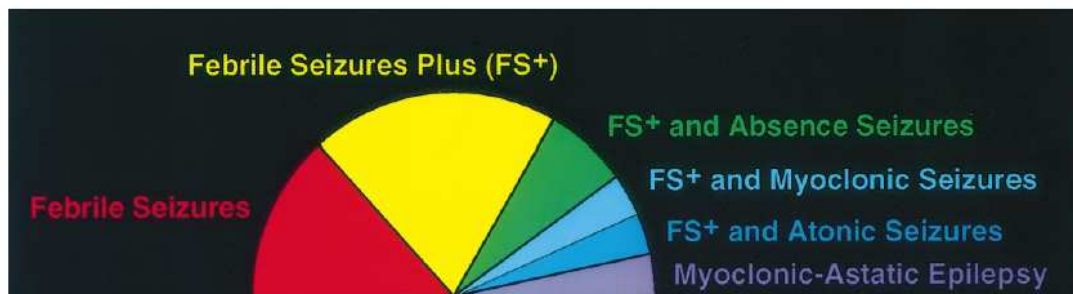
Le mutazioni responsabili dell'insorgenza della BFNIS sono state identificate nel canale voltaggio dipendente del sodio  $\text{Na}_v1.2$ . Le mutazioni individuate sono tutte missenso (Heron et al., 2002; Lewis et al., 1996; Berkovic et al., 2004, Striano et al., 2006). L'analisi dell'effetto funzionale di alcune di queste mutazioni, condotta da Scalmani et al. nel 2006 tramite espressione dei canali  $\text{rNa}_v1.2$  mutati in neuroni corticali di ratto in coltura primaria, ha rivelato una *gain of function* di questi mutanti. La mutazione L1330F, che comporta la sostituzione di una leucina con una fenilalanina nel *linker* citoplasmatico tra il segmento S4 e S5 del dominio III, una regione del canale che sembra rappresentare parte dell'ipotetico recettore del cancello di inattivazione (Catterall, 2000), porta ad uno spostamento depolarizzante di circa 5 mV della curva di voltaggio dipendenza dell'inattivazione. Tale spostamento farebbe aumentare il numero di canali ancora attivi in prossimità del potenziale di riposo determinando così una maggiore eccitabilità. La mutazione L1563V sostituisce un'arginina con una valina nel segmento S2 del quarto dominio, inducendo uno spostamento iperpolarizzante di circa 5 mV della curva di voltaggio dipendenza dell'attivazione. Tale alterazione, rende i canali attivabili da depolarizzazioni di minore entità, provocando un incremento nella corrente di sodio. Le mutazioni R223Q e R1319Q, localizzate rispettivamente nel segmento S4 del dominio I e III, neutralizzano uno dei residui carichi che contraddistinguono il cosiddetto sensore del voltaggio. Queste mutazioni producono delle alterazioni nelle proprietà biofisiche del canale, che possono essere ritenute responsabili tanto di una maggiore (spostamento depolarizzante della curva di voltaggio dipendenza dell'inattivazione, cinetiche di inattivazione più lente) quanto di una minore (spostamento in direzione depolarizzante della curva di voltaggio dipendenza dell'attivazione e cinetiche di attivazione più lente) eccitabilità. Per capire quali sono le effettive conseguenze funzionali delle mutazioni, i neuroni trasfettati con i canali mutati o wild type sono stati stimolati con

potenziali fisiologici (sottosoglia o potenziali d'azione) ed è stata analizzata la quantità di corrente registrata nelle diverse condizioni. E' stata riscontrata una maggiore corrente di sodio per i neuroni trasfettati con i canali mutanti, sia nel caso di una stimolazione sottosoglia sia nel caso venissero stimolati con un potenziale d'azione, indicando quindi anche in questo caso una situazione di aumentata eccitabilità.

Le mutazioni BFNIS generano quindi delle alterazioni nelle proprietà di  $Na_v1.2$  che portano ad una condizione di ipereccitabilità neuronale. Si tratta comunque di effetti di modesta entità, il che concorda con il fenotipo non grave della patologia. La remissione dalle crisi entro il primo anno di vita può essere spiegata tenendo conto della maturazione del sistema inibitorio GABAergico e della sostituzione dei canali  $Na_v1.2$  con i canali  $Na_v1.6$  a livello dei nodi di Ranvier che si verifica nel corso dello sviluppo. A conferma di questa ipotesi Liao et al. nel 2010 hanno dimostrato, tramite esperimenti di immunistoichimica e RT-PCR che l'espressione di  $Nav1.2$ , che viene espresso nell'AIS di neuroni ippocampali e corticali, durante lo sviluppo viene gradualmente sostituito da  $Nav1.6$ .

### GEFS+

La GEFS+ è un'epilessia familiare caratterizzata da trasmissione autosomica dominante descritta per la prima volta da Berkovic e Sheffer nel 1997. Questa patologia è caratterizzata da una variabilità fenotipica inter- e intra-familiare estremamente elevata. Gli affetti mostrano infatti fenotipi estremamente diversi, che vanno da quadri clinici molto lievi come le



**Fig.15: Rappresentazione schematica dei diversi fenotipi di GEFS<sup>+</sup> (esclusa la SMEI).** (Sheffer et al., 1997)

convulsioni febbrili tipiche (FS) o che persistono oltre i sei anni di età (FS+), a quadri clinici moderatamente gravi, quando le FS+ sono associate a crisi non-febbrili tonico-cloniche<sup>29</sup>, a

<sup>29</sup> Crisi tonico-cloniche: La fase tonica consiste in un'attivazione motoria diffusa che si estrinseca con una rigida contrazione dei muscoli ed ha una durata di circa 30 secondi; evolve quindi nella fase clonica che è una conseguenza della progressiva comparsa dei fenomeni inibitori che bloccano in modo intermittente la contrazione muscolare e si esprime con ampie scosse muscolari diffuse.

crisi di assenza<sup>30</sup>, a crisi miocloniche<sup>31</sup> o atoniche<sup>32</sup>, infine a quadri clinici estremamente gravi come l'epilessia mioclonica-astatica (MAE) e l'epilessia mioclonica grave dell'infanzia SMEI (Fig 15).

E' possibile distinguere la GEFS+ in tre gruppi, a seconda dei geni interessati dalle mutazioni.

Le GEFS+ di tipo 1 presentano mutazioni a carico del gene SCN1B, che codifica per la subunità  $\beta 1$  del canale voltaggio dipendente del  $\text{Na}^+$ . La prima mutazione caratterizzata da Wallace et al. nel 1998, C121W, comporta una sostituzione di una cisteina altamente conservata, posta nel dominio extracellulare, con un triptofano; tale mutazione ha effetti sulla struttura secondaria del canale, la cui alterazione compromette probabilmente la sua capacità di interazione con la subunità  $\alpha$  (Meadows et al., 2002). Recentemente questa mutazione è stata individuata anche in pazienti affetti da TLE in tre famiglie GEFS+, permettendo l'inclusione della TLE nello spettro delle GEFS+ (Scheffer et al., 2007). In uno dei soggetti affetti la TLE è stata diagnosticata prima della comparsa di convulsioni febbrili, il che dimostra come la TLE non possa essere considerata semplicemente una conseguenza dei danni neuronali scatenati dalle crisi generalizzate.

Le mutazioni di SCN1B legate a GEFS+ fino ad oggi identificate sono quattro: C121W (Wallace et al., 1998); R85C ed R85H (Scheffer et al., 2007), una delezione di cinque aminoacidi al suo N-terminale identificata da Audenaert et al. nel 2003.

Le GEFS+ di tipo 2 presentano mutazioni a carico dei geni SCN1A (Tab.3) e che codifica per l'isoforma  $\text{Na}_v1.1$  del canale voltaggio dipendente del sodio. Lo studio funzionale di mutanti di SCN1A in sistemi eterologhi ha rivelato che in alcuni casi queste mutazioni determinano un incremento e in altri una diminuzione della funzionalità del canale. Tuttavia, l'effetto finale di queste mutazioni sul canale non può essere definito con chiarezza, in quanto altamente dipendente dal sistema di espressione utilizzato per lo studio.

Alcune mutazioni sono state identificate anche nel gene SCN2A, codificante per l'isoforma  $\text{Na}_v1.2$  (Sugawara et al., 2001b), ma questi dati sono ancora contraddittori (Mantegazza & Marini 2010).

Le GEFS+ di tipo 3 sono caratterizzate da mutazioni situate sul gene GABRG2 che codifica per la subunità  $\gamma_2$  del recettore  $\text{GABA}_A$  (Wallace et al., 2001b; Baulac et al., 2001). Le due mutazioni finora conosciute sono in differenti zone del canale: R43Q si trova nel *loop*

---

<sup>30</sup> Crisi di assenza: prototipo di crisi non convulsive. Sono caratterizzate da perdita di coscienza senza caduta a terra e non sono accompagnate da nessun altro sintomo. Eventualmente possono essere presenti dei segni motori lievi come il battito delle palpebre.

<sup>31</sup> Crisi miocloniche: caratterizzate da scosse muscolari brevi, bilaterali simmetriche o asimmetriche.

<sup>32</sup> Crisi atoniche: caratterizzate da un improvvisa perdita del tono motorio.

extracellulare all’N-terminale, nel sito di legame delle benzodiazepine, mentre K289M nel *loop* che collega i due segmenti transmembrana M2 e M3. L’espressione delle subunità mutante K289M con le subunità  $\alpha 1$  e  $\beta 2$  causa una riduzione di dieci volte della corrente attivata dal GABA, mentre l’espressione delle subunità mutante R43Q non modifica la conduttanza ma abolisce la sensibilità alle benzodiazepine, lasciando pensare che esistano naturalmente delle “endozepine” che impediscono l’insorgenza di crisi epilettiche. E’ stata inoltre individuata una mutazione che introduce un codone di stop in corrispondenza della glutammina 351 (Harkin et al., 2002), che porta quindi alla produzione di una subunità  $\gamma_2$  tronca e non funzionale. L’effetto di queste mutazioni è dunque una perdita di funzione del canale, il che comporta una mancata funzionalità dei circuiti inibitori.

#### Phenotype: GEFS+

|    | cDNA position | Predicted protein change | Protein domain | Phenotype              | Inheritance                               | Citations  |
|----|---------------|--------------------------|----------------|------------------------|---|--|
| 1  | c.78_79delAA  | p.Arg27ThrfsX17          | N-terminal     | GEFS+                  | father not available                      | Löfgren A, 2010  |
| 2  | c.563A>T      | p.Asp188Val              | DIS2-S3        | GEFS+                  | familial                                  | Lopes-Cendes I, 2000<br>Wallace RH, 2001<br>Cossette P, 2003         |
| 3  | c.650C>G      | p.Thr217Arg              | DIS4           | GEFS+                  | maternal                                  | Löfgren A, 2010  |
| 4  | c.652T>C      | p.Phe218Leu              | DIS4           | GEFS+, PS              | 2x familial                               | Livingston JH, 2009  |
| 5  | c.1130G>A     | p.Arg377Gln              | DIS5-S6        | GEFS+                  | maternal                                  | Zucca C, 2008  |
| 6  | c.1162T>C     | p.Tyr388His              | DIS5-S6        | GEFS+                  | familial                                  | Mahoney K, 2009  |
| 7  | c.1625G>A     | p.Arg542Gln              | DI-DII         | JME, autism, GEFS+     | 2x not available, 1x paternal, 1x de novo | Escayg A, 2001<br>Weiss LA, 2003<br>Combi R, 2009<br>Löfgren A, 2010 |
| 8  | c.1985C>A     | p.Ser662X                | DI-DII         | GEFS+                  | de novo                                   | Yu MJ, 0   |
| 9  | c.2177-11dupT |                          | -              | GEFS+                  | 2x familial                               | Mrabet H, 2007   |
| 10 | c.2369A>G     | p.Tyr790Cys              | DIIS1-S2       | GEFS+                  | paternal                                  | Annesi G, 2003   |
| 11 | c.2575C>T     | p.Arg859Cys              | DIIS4          | GEFS+, Dravet syndrome | 1x familial, 1x de novo                   | Barela AJ, 2006<br>Depienne C, 2009<br>Sijben AE, 2009               |
| 12 | c.2624C>T     | p.Thr875Met              | DIIS4          | GEFS+                  | familial                                  | Escayg A, 2000   |
| 13 | c.2726dupT    | p.Met909IlefsX6          | DIIS5          | GEFS+                  | de novo                                   | Löfgren A, 2010  |
| 14 | c.2803A>C     | p.Asn935His              | DIIS5-S6       | GEFS+                  | familial                                  | Sun H, 2008<br>Sun H, 2008   |
| 15 | c.2901G>T     | p.Met967Ile              | DIIS6          | GEFS+                  | familial                                  | Selmer KK, 2008  |
| 16 | c.2927T>C     | p.Met976Thr              | DIIS6          | GEFS+                  | maternal                                  | Löfgren A, 2010  |
| 17 | c.3610T>C     | p.Trp1204Arg             | DII-DIII       | GEFS+                  | 2x familial                               | Escayg A, 2001<br>Marini C, 2007<br>Sijben AE, 2009                  |
| 18 | c.3809A>C     | p.Lys1270Thr             | DIIS2          | GEFS+                  | familial                                  | Abou-Khalil B, 2001<br>Sijben AE, 2009                               |
| 19 | c.3925C>T     | p.Leu1309Phe             | DIIS4          | GEFS+                  | probably familial                         | Dimova PS, 2010  |
| 20 | c.3955delA    | p.Arg1319GlufsX3         | DIIS4          | GEFS+                  | de novo                                   | Löfgren A, 2010  |



|    |           |              |            |                                     |  |  |
|----|-----------|--------------|------------|-------------------------------------|--|--|
| 21 | c.3967C>T | p.Pro1323Ser | DIIIS4     | GEFS+                               | 1x paternal,<br>1x familial                      | Löfgren A, 2010  |
| 22 | c.4057G>C | p.Val1353Leu | DIIIS5     | GEFS+                               | familial   | Wallace RH, 2001   |
| 23 | c.4096G>A | p.Val1366Ile | DIIIS5     | GEFS+, ICEGTC, FS + MS              | familial   | Osaka H, 2007  |
| 24 | c.4314G>A | p.Met1438Ile | DIIIS5-S6  | GEFS+                               | familial   | Löfgren A, 2010  |
| 25 | c.4555C>A | p.Pro1519Thr | DIII-DIV   | GEFS+                               | not available                                    | Löfgren A, 2010  |
| 26 | c.4786C>T | p.Arg1596Cys | DIVS2-S3   | SIMFE, GEFS+, Dravet syndrome, SMEB | 3x de novo,<br>1x familial                       | Dlugos DJ, 2007<br>Harkin LA, 2007<br>Depienne C, 2009<br>Löfgren A, 2010  |
| 27 | c.4793A>T | p.Tyr1598Phe | DIVS2-S3   | GEFS+                               | 2x not available                                 | Löfgren A, 2010  |
| 28 | c.4847T>C | p.Ile1616Thr | DIVS3      | GEFS+, FS+                          | 3x unknown                                       | Hattori J, 2008  |
| 29 | c.4943G>A | p.Arg1648His | DIVS4      | GEFS+, Dravet syndrome              | 1x familial,<br>1x paternal,<br>1x not available | Baulac S, 1999<br>Alekov A, 2000<br>Escayg A, 2000<br>Spampanato J, 2001<br>Lossin C, 2002<br>Rhodes TH, 2004<br>Spampanato J, 2004<br>Kahlig KM, 2006<br>Vanoye CG, 2006<br>Depienne C, 2009<br>Tang B, 2009<br>Löfgren A, 2010 |
| 30 | c.4968C>G | p.Ile1656Met | DIVS4      | GEFS+                               | familial   | Wallace RH, 2001   |
| 31 | c.4969C>T | p.Arg1657Cys | DIVS4      | GEFS+                               | familial   | Lossin C, 2003<br>Grant AC, 2005<br>Vanoye CG, 2006  |
| 32 | c.5002C>G | p.Pro1668Ala | DIVS4-S5   | SMEI, GEFS+                         | familial   | Nabbout R, 2003<br>Kanai K, 2004<br>Mancardi MM, 2006  |
| 33 | c.5060T>C | p.Phe1687Ser | DIVS5      | GEFS+, MAE                          | familial   | Marini C, 2007   |
| 34 | c.5213A>G | p.Asp1742Gly | DIVS5-S6   | GEFS+, MAE                          | familial   | Pineda-Trujillo N, 2005<br>Sijben AE, 2009   |
| 35 | c.5383G>A | p.Glu1795Lys | C-terminal | GEFS+                               | familial   | Li N, 2010   |
| 36 | c.5555T>C | p.Met1852Thr | C-terminal | SMEI, GEFS+                         | not available                                    | Annesi G, 2003<br>Kanai K, 2004<br>Rusconi R, 2007   |
| 37 | c.5561T>C | p.Leu1854Ser | C-terminal | GEFS+                               | de novo  | Löfgren A, 2010  |
| 38 | c.5569G>T | p.Val1857Leu | C-terminal | GEFS+                               | familial   | Nagao Y, 2005<br>Sijben AE, 2009   |
| 39 | c.5596G>T | p.Asp1866Tyr | C-terminal | GEFS+                               | familial   | Spampanato J, 2004<br>Sijben AE, 2009  |
| 40 | c.5600T>C | p.Ile1867Thr | C-terminal | GEFS+                               | familial   | Hindocha N, 2008   |
| 41 | c.5752T>A | p.Ser1918Thr | C-terminal | GEFS+                               | maternal   | Löfgren A, 2010  |
| 42 | c.5779A>G | p.Arg1927Gly | C-terminal | GEFS+                               | paternal   | Combi R, 2007<br>Combi R, 2007<br>Combi R, 2009<br>Rusconi R, 2009   |

**Tab. 3: Varianti di SCN1A che causano GEFS+.** Da “SCN1A variant database”, aggiornato il 28/8/2010 (<http://www.molgen.ua.ac.be/SCN1AMutations/Home/Default.cfm>)

### SMEI

L'epilessia mioclonica grave dell'infanzia, nota anche come sindrome di Dravet, dal nome di colei che per prima la descrisse nel 1978, viene considerata un'encefalopatia<sup>33</sup> epilettiforme.

<sup>33</sup> Encefalopatia: patologia cerebrale, di diversa eziologia, contraddistinta da neuro-degenerazione.

Quest'epilessia farmaco resistente insorge intorno al primo anno di vita e si manifesta con crisi generalizzate toniche, cloniche e tonico-cloniche inizialmente indotte da febbre. Successivamente i pazienti sono soggetti anche ad altri tipi di crisi quali mioclonie, crisi di assenza e crisi parziali. Entro due anni dall'insorgenza della malattia, gli affetti vanno incontro a declino mentale e a rallentamento nello sviluppo psicomotorio.

**Table 2** Distribution patterns of missense mutations in GEFS+, SMEI, SMEB, and the total SMEI group

| Segment            | GEFS+ | SMEI | SMEB | SMEIBS |
|--------------------|-------|------|------|--------|
| S1                 | 0     | 2    | 0    | 2      |
| S1-S2 linker       | 1     | 0    | 0    | 0      |
| S2                 | 1     | 2    | 1‡   | 3      |
| S2-S3 linker       | 1     | 1    | 0    | 1      |
| S3                 | 1     | 1    | 0    | 1      |
| S3-S4 linker       | 0     | 0    | 1    | 1      |
| S4*                | 3     | 3    | 0    | 3      |
| S4-S5 linker       | 1§    | 2§   | 0    | 2      |
| S5†                | 2¶    | 4¶   | 3    | 7      |
| S5-S6 linker†      | 2§    | 12§  | 8§¶  | 17     |
| S6†                | 0     | 6    | 2    | 8      |
| Interdomain linker | 1     | 1    | 1‡   | 2      |
| N-terminal         | 0     | 3    | 1    | 4      |
| C-terminal         | 1§    | 5    | 1    | 6§     |

\* "Voltage sensor" region in *SCN1A*.

† "Pore" forming region in *SCN1A*.

‡ T808S/N1011S is counted both in S2 and in the interlinker domain.

§ P1668A and M1852T are counted in both GEFS+ and SMEI, and T1709I in both GEFS+ and SMEB.

¶ F1692S is counted only in SMEI, because the father of the patient with F1692S showed only simple FS.

¶ R931C, M934I, and R946C are counted both in SMEI and SMEB.

GEFS+ = generalized epilepsy with febrile seizures plus; SMEI = severe myoclonic epilepsy of infancy; SMEB = borderline SMEI; FS = febrile seizures.

mosaicismo<sup>35</sup> (Morimoto et al., 2006).

**Tab. 4: distribuzione delle mutazioni missenso trovate in pazienti GEFS+, SMEI, SMEB e FS.** (Kanai et al., 2004)

L'80% degli individui affetti da SMEI presenta mutazioni del gene *SCN1A* (sono state individuate fino ad ora più di 600 mutazioni). Circa un terzo di queste mutazioni sono missenso, mentre i restanti due terzi sono mutazioni nonsense e *frameshift*<sup>34</sup>, che portano alla produzione di una proteina trunca.

Buona parte delle mutazioni di *SCN1A* che causano SMEI sono *de novo*; tuttavia sono state individuate anche mutazioni familiari per *SCN1A*, spesso ereditate da genitori asintomatici o affetti da forme di epilessia più lievi. Il fatto che la stessa mutazione abbia effetti molto differenti in individui diversi sottolinea l'influenza del background genetico, delle modificazioni ambientali e l'eventuale possibilità che si verifichino fenomeni di

Dallo studio di Kanai et al. nel 2004, in cui è stata analizzata la correlazione fra localizzazione delle mutazioni missenso di

<sup>34</sup> Mutazione *frameshift*: Sono mutazioni causate dall'aggiunta (inserzione) o l'eliminazione (delezione) di uno o pochi nucleotidi. Nel caso di inserzione o delezione di nucleotidi in numero non multiplo di tre, viene alterato l'ordine di lettura *frame* di tutti i codoni successivi nell'ordine a quello inserito o deletato.

<sup>35</sup> Mosaicismo: durante lo sviluppo di un organismo possono avvenire mutazioni nel genoma di cellule di tessuti germinali o somatici che generano individui con mosaicismo, cioè con due (o più) linee cellulari geneticamente distinte. Quindi, è possibile che l'individuo non sia interessato da una malattia genetica, ma la sua prole (nel caso in cui la mutazione sia avvenuta nella linea germinale) possa presentare invece la patologia determinata dalla mutazione.

SCN1A e la gravità dei fenotipi, è emerso che le mutazioni SMEI sono posizionate soprattutto in corrispondenza del poro del canale (S5, *linker* S5-S6, S6) (Tab.4).

Non solo la localizzazione della mutazione ma anche il tipo di sostituzione aminoacidica sembra giocare un ruolo di rilievo nel determinare la gravità della malattia, come dimostra il caso del mutante R1648. Infatti se l'arginina in posizione 1648 è sostituita con una istidina (R1648H) si ha insorgenza di GEFS+, mentre se è sostituita con una cisteina (R1648C) si ha insorgenza di SMEI.

Due modelli animali della SMEI sono stati studiati da Yu et al. nel 2006 e da Ogiwara et al. nel 2007. Yu et al. hanno creato un topo *knock out* per il gene SCN1A in cui l'ultimo esone è stato rimosso, con conseguente produzione di una proteina tronca a valle del segmento S3 del dominio IV. I topi omozigoti *knock out* mostrano atassia e crisi epilettiche a partire da P9 e muoiono a P15; gli eterozigoti manifestano crisi tra P21 e P27 e una maggiore incidenza di morte, con una suscettibilità correlata al ceppo di appartenenza. L'analisi delle correnti di Na<sup>+</sup> in neuroni ippocampali dissociati evidenzia una diminuzione della corrente di Na<sup>+</sup> degli omozigoti e degli eterozigoti rispetto al wild type, ma solo negli interneuroni. Oltretutto questo calo nella corrente di Na<sup>+</sup> non è lineare, ma per gli omozigoti si registra una diminuzione minore di quanto atteso, lasciando ipotizzare l'esistenza di qualche meccanismo compensatorio. Studi di immuno-citochimica infatti mostrano un'up-regolazione nell'espressione di Na<sub>v</sub>1.3 selettiva per gli interneuroni. Altre alterazioni, riscontrate negli interneuroni, sono la perdita di una relazione lineare tra corrente iniettata e numero di potenziali d'azione e una minor ampiezza di questi ultimi. Gli effetti descritti da questo modello animale spiegano l'insorgenza delle crisi epilettiche con una riduzione del tono inibitorio, dovuta all'ipo-eccitabilità degli interneuroni GABAergici.

Ogiwara et al. hanno prodotto un topo *knock-in* che possiede nel gene SCN1A la mutazione R1407X correlata all'insorgenza di SMEI. I topi omozigoti presentano contrazioni involontarie della muscolatura e crisi tonico-cloniche o cloniche tra P12 e P16. Da P10 cominciano a esibire un'andatura instabile che comporta uno svantaggio per la nutrizione e muoiono entro la terza settimana. Gli eterozigoti manifestano crisi dopo la terza settimana di vita, hanno una maggiore frequenza di morti improvvise e nel 25-45% dei casi muoiono tra il primo e il terzo mese. Non sono state evidenziate grosse anomalie anatomiche, cambiamenti nella densità cellulare o fenomeni di up-regolazione di altre isoforme di canali nel cervello dei topi *knock-in*. Dagli studi di immuno-citochimica emerge un dato che contrasta con quanto tradizionalmente descritto in letteratura sulla distribuzione di Na<sub>v</sub>1.1. Infatti mentre altri gruppi (Westenbroek et al., 1989; Gong et al., 1999) indicano una localizzazione di Na<sub>v</sub>1.1 nella regione somato-dendritica dei neuroni, gli autori sostengono una localizzazione

di Na<sub>v</sub>1.1 nell' AIS di interneuroni parvalbumina positivi. Tramite esperimenti di *patch clamp* sono state poi valutate le proprietà di *firing* degli interneuroni corticali parvalbumina positivi nei topi eterozigoti ed è stata identificata una diminuzione nell'ampiezza delle *spikes* durante treni prolungati di potenziali d'azione ed un potenziale più negativo della membrana a riposo. Queste alterazioni, che riducono l'efficacia dei circuiti inibitori mediati dagli interneuroni parvalbumina positivi, possono pertanto portare allo scatenarsi di crisi epilettiche.

Mutazioni di SCN2A associate alla sindrome di Dravet sono molto rare e nei casi riportati la segregazione con il fenotipo non è molto buona. La mutazione R102X è stata identificata nel gene SCN2A in un paziente con epilessia farmaco-resistente e declino mentale, quindi con un quadro clinico correlato a quello della SMEI (Kamiya et al., 2004). Questa mutazione è localizzata nella porzione N-terminale del canale e produce una proteina tronca; gli esperimenti di *patch clamp* condotti su cellule HEK co-trasfettate con Na<sub>v</sub>1.2 wild type e Na<sub>v</sub>1.2R102X mettono in luce un meccanismo di dominanza negativa esercitato dal mutante. L'analisi della distribuzione subcellulare di Na<sub>v</sub>1.2R102X fa ipotizzare che esso interferisca in maniera diretta o indiretta con le interazioni tra Na<sub>v</sub>1.2 wild type ed elementi del citoscheletro come l'anchirina, condizionando così il *gating* del canale. Un'altra mutazione, la R1312T, è stata individuata (Shi et al., 2009) a carico di questa isoforma, ma i suoi effetti funzionali non sono ancora stati studiati.

Nel 2009 Patino et al. hanno individuato la prima mutazione causante SMEI a carico del gene SCN1B, R125C. L'analisi funzionale ha rivelato che questa mutazione causa la *loss of function* della subunità  $\beta 1$ , che si riflette in una diminuita capacità di interagire con la subunità  $\alpha$  del canale voltaggio-dipendente del sodio e con altre proteine interagenti. Sebbene gli effetti finali di questa mutazione sull'eccitabilità non siano stati ancora chiariti, a causa della suscettibilità della subunità  $\beta 1$  wt al sistema di espressione utilizzato (Marini and Mantegazza, 2010), la caratterizzazione in diversi sistemi eterologhi come cellule HEK e e cellule CHL1610 (*Chinese hamster lung fibroblast cells*) indica che probabilmente la *loss of function* è legata a difetti di *folding* della subunità  $\beta 1$  mutante (Patino et al., 2009).

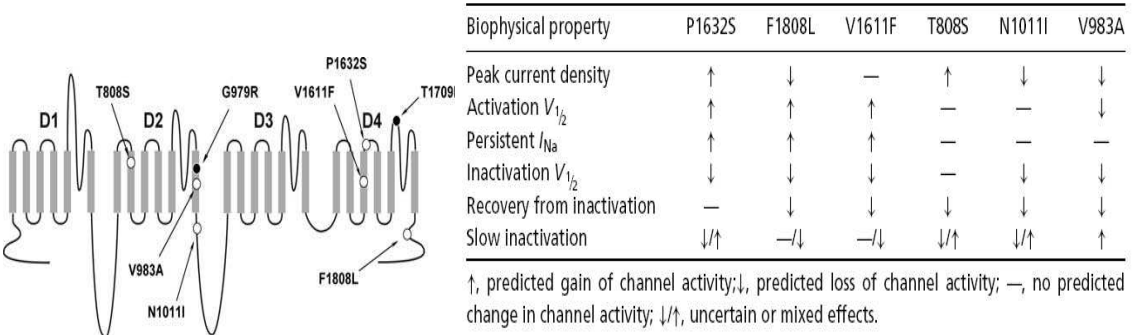
Infine, in due famiglie manifestanti fenotipi SMEI sono state individuate nel gene GABRG2 la mutazione nonsense Q390X, che porta alla produzione di una subunità  $\gamma 2$  priva di 78-aminoacidi terminali, e la mutazione Q40X, che tronca la proteina a livello del primo aminoacido del peptide maturo. La mutazione Q390X, caratterizzata in oociti di *Xenopus* e in cellule HEK in presenza delle subunità  $\alpha 1$  e  $\beta 2$ , causa la *loss of function* completa del recettore del GABA<sub>A</sub> (associata alla sua ritenzione nel reticolo endoplasmatico) in condizioni in cui viene mimata l'omozigosi, mentre induce una riduzione del 50% della corrente in condizioni che mimano eterozigosi (Macdonald et al., 2010). Gli effetti di mutazioni del

recettore del GABA<sub>A</sub>, come avviene anche per molti mutanti di Na<sub>v</sub>1.1, sono quindi consistenti con una riduzione dell'inibizione GABAergica.

### ICEGTC

Nel 1979 Seino e Higashi hanno riportato un gruppo di 24 pazienti con epilessia refrattaria nell'infanzia caratterizzata dall'occorrenza di frequenti crisi tonico-cloniche. Le crisi comparivano nel primo anno di vita, spesso indotte da febbre; tutti i pazienti, inoltre, presentavano declino mentale e, in alcuni casi, atassia o ipotonia. Questa patologia venne in seguito chiamata *intractable childhood epilepsy with generalized tonic-clonic seizures* (ICEGTC) (Fujiwara et al., 1992). Il 70% dei pazienti affetti da ICEGTC presenta mutazioni missenso del gene SCN1A (Fujiwara et al., 2003).

Rhodes et al. nel 2005 hanno caratterizzato in cellule tsA201 otto mutanti di SCN1A causanti ICEGTC (Fig. 16). Due di questi mutanti (G979R e T1709I) sono risultati essere non funzionali, mentre gli altri (T808S, V983A, N1011I, V1611F, P1632S e F1808L) sono in grado di generare correnti di sodio misurabili di varia entità, e condizionano le proprietà biofisiche in modo diverso. I risultati ottenuti con queste caratterizzazioni indicano che i mutanti associati a ICEGTC producono uno spettro di effetti piuttosto ampio, dalla compromissione del meccanismo di gating, allo *shift* della voltaggio-dipendenza e alla riduzione dell'uso-dipendenza.



**Fig. 16: Mutazioni ICEGTC caratterizzate da Rhodes et al nel 2005.** A sinistra, nella schematizzazione di Na<sub>v</sub>1.1 viene riportata la posizione di mutazioni ICEGTC nel canale. A destra, una tabella riassuntiva degli effetti di mutanti di Na<sub>v</sub>1.1 che causano ICEGTC sulle proprietà biofisiche del canale. (Rhodes et al., 2005)

### Altre epilessie associate a mutazioni di SCN1A

Per analizzare la variabilità fenotipica associata a mutazioni di SCN1A, nel 2007 Harkin et al. hanno esaminato 188 pazienti con fenotipi epilettici piuttosto vari alla ricerca di variazioni nella sequenza di SCN1A. Tutti i pazienti inseriti nello studio avevano un *onset* delle crisi nei primi due anni di vita. Mutazioni di SCN1A sono state identificate in 90

pazienti, di cui 77 che rientravano nello spettro della SMEI (di cui uno con ICEGTC), sei affetti da epilessia criptogenica<sup>36</sup> generalizzata, quattro con epilessia criptogenica focale, due con epilessia mioclonico-astatica<sup>37</sup> e uno con sindrome di Lennox-Gastaut<sup>38</sup>. Questo ampio studio ha permesso di espandere lo spettro di fenotipi associati a mutazioni di SCN1A.

Un'altra patologia legata a mutazioni di SCN1A è la sindrome di Panayotopoulos, un disordine caratterizzato da crisi benigne focali che si presentano durante l'infanzia; le crisi spesso sono prolungate, con prominenti sintomi autonomi. Il 17% di questi pazienti presentano familiarità per FS. In alcuni casi sono state individuate mutazioni a carico di SCN1A, ma queste mutazioni non sono ancora state caratterizzate (Grosso et al., 2007; Livingston et al., 2009).

Queste scoperte supportano l'ipotesi che SCN1A possa anche essere un gene che condiziona la suscettibilità per altre epilessie focali idiopatiche, inclusa la TLE e la sindrome di Panayotopoulos.

### Convulsioni febbrili

Le convulsioni febbrili (FS) costituiscono il fenomeno convulsivo più diffuso, interessando il 5% dei bambini in età compresa tra sei mesi e sei anni (Baluac et al., 2004). Esse però non rappresentano una patologia epilettica ma una sindrome a sé stante, caratterizzata dalla febbre come evento scatenante e da un tipico intervallo di età in cui si manifestano. La prognosi è generalmente buona, ma gli affetti hanno un rischio maggiore di sviluppare in età adulta delle forme di epilessia. In particolare è stata osservata una forte associazione tra crisi febbrili complesse ed epilessia del lobo temporale. Una storia familiare

| Locus       | Chromosomal region | Country   | References             |                                  |
|-------------|--------------------|-----------|------------------------|----------------------------------|
| <i>FEB1</i> | 8q13-q21           | Australia | Wallace et al. (1996)  | di FS è presente nel 20-40% dei  |
| <i>FEB2</i> | 19p13.3            | USA       | Johnson et al. (1998)  | pazienti; inoltre è stato        |
| <i>FEB3</i> | 2q23-q24           | USA       | Peiffer et al. (1999)  | riscontrato un più alto tasso di |
| <i>FEB4</i> | 5q14-q15           | Japan     | Nakayama et al. (2000) | concordanza tra gemelli          |
| <i>FEB5</i> | 6q22-q24           | France    | Nabbout et al. (2002)  | monozigotici che dizigotici.     |
| <i>FEB6</i> | 18p11.2            | Japan     | Nakayama et al. (2004) | Risulta quindi evidente          |

**Tab. 5: Loci genici associati alla comparsa di FS.** (Nakaiama et al., 2005)

l'esistenza di un contributo genetico all'insorgenza delle FS,

<sup>36</sup> epilessie criptogenetiche: sono epilessie che non hanno una causa organica visibile.  
<sup>37</sup> Epilessia mio clonico-astatica: è una forma rara di epilessia ad esordio tra il secondo e il quinto anno di vita. Lo sviluppo psicomotorio è di solito normale prima della comparsa dell'epilessia. La malattia si manifesta inizialmente con crisi toniche-cloniche. In alcuni casi, possono verificarsi convulsioni multiple in un breve arco di tempo, eventualmente anche nello stesso giorno.  
<sup>38</sup> Sindrome di Lennox-Gastaut: è un'epilessia dell'infanzia, di tipo generalizzato, caratterizzata da scarsa risposta agli antiepilettici, prognosi sfavorevole e limitato sviluppo intellettuale.

sebbene le modalità di trasmissione non siano ancora state chiarite. Si tratta probabilmente di una patologia multifattoriale.

Loci genici associati alla comparsa di FS sono: FEB1 sul cromosoma 8q13-21, FEB2 sul cromosoma 19p13.3, FEB3 sul cromosoma 2q23-24, FEB4 sul cromosoma 5q14-q15, FEB5 sul cromosoma 6q22-24, FEB6 sul cromosoma 18p11.2 (Tab.5) (Nakayama et al., 2005).

Sono stati condotti anche studi di associazione che confrontano la frequenza di uno specifico allele tra soggetti affetti da una determinata patologia e soggetti non affetti. Sono state così delineate alcune associazioni positive per le FS: interleuchina 1B (IL1B), che è una citochina pro-infiammatoria implicata nella genesi della febbre; l'antagonista del recettore per l'interleuchina 1B (IL1RN); la subunità  $\gamma 2$  del recettore GABA A (GABRG2); la subunità  $\alpha 4$  del recettore nicotinico per l'acetilcolina (CHRNA4); l'isoforma  $\gamma 2$  della casein-chinasi I (CSNK1G2) che è coinvolta nel *trafficking* vescicolare e nel rilascio di neurotrasmettitori

| Gene           | No. of cases | Population | References             |
|----------------|--------------|------------|------------------------|
| <i>IL1B</i>    | 35           | Finnish    | Virta et al. (2002)    |
| <i>IL1RN</i>   | 51           | Chinese    | Tsai et al. (2002)     |
| <i>GABRG2</i>  | 104          | Chinese    | Chou et al. (2003a,b)  |
| <i>CHRNA4</i>  | 102          | Chinese    | Chou et al. (2003a,b)  |
| <i>CSNK1G2</i> | 60           | Chinese    | Ma et al. (2004)       |
| <i>IMPA2</i>   | 112          | Japanese   | Nakayama et al. (2004) |

**Tab. 6: Studi di associazione di specifici alleli nelle FS.** (Nakaiama et al., 2005)

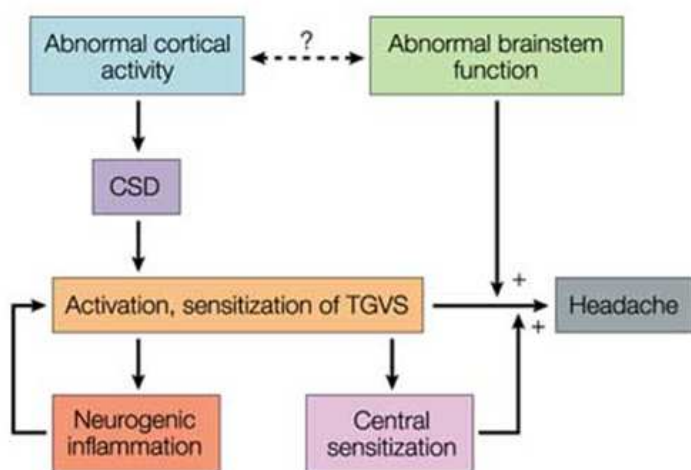
dalla piccole vescicole sinaptiche; la mio-inositolo mono-fosfatasi 2 (IMPA2), elemento della via segnale del fosfatidil-inositolo (Tab.6) (Nakayama et al, 2006).

Nel 2005 è stata identificata la prima mutazione responsabile di FS pure (Mantegazza et al., 2005). Si tratta della mutazione M145T del canale voltaggio dipendente del sodio hNa<sub>v</sub>1.1, situata nel primo segmento transmembranario del dominio I. L'espressione eterologa del mutante in cellule tsA-201 mostra una riduzione del 60% della densità di corrente e uno spostamento depolarizzante della curva di voltaggio dipendenza dell'attivazione, determinando così una perdita di funzione. Resta ancora da chiarire il meccanismo attraverso il quale la perdita di funzione di hNa<sub>v</sub>1.1M145T generi un quadro di ipereccitabilità che conduce all'insorgenza di convulsioni febbrili.

### Emicrania emiplegica familiare

Mutazioni del gene SCN1A, oltre a causare l'epilessia, sono associate anche ad emicrania emiplegica familiare (*familial hemiplegic migraine*, FHM) di tipo 3, un sottotipo di emicrania con ereditarietà autosomica dominante.

L'emicrania è una patologia comune che colpisce circa il 12% della popolazione. Si distinguono due classi di emicrania: con aura<sup>39</sup> o senza aura. La patologia emicranica, in particolare quella con aura, ha una forte componente genetica con una probabile ereditarietà poligenica. La comparsa della sensazione dolorifica, che contraddistingue il mal di testa, sembra dipendere dalla stimolazione del sistema trigeminovascolare con conseguente dilatazione dei vasi delle meningi (Fig.16). Studi in modelli animali (Parson, 2004; Pietrobon and Striessnig, 2003; Waeber and Moskowitz, 2003) supportano l'idea che l'attivazione del sistema trigeminovascolare sia collegata con il fenomeno della "*cortical spreading depression*" (CSD). L'espressione "*cortical spreading depression*" definisce un'onda di depolarizzazione neuronale, che si propaga lentamente attraverso la corteccia, ed è seguita da una prolungata soppressione dell'attività neuronale.



**Fig.17:** Possibili meccanismi fisio-patologici implicati nell'insorgenza dell'emicrania (Pietrobon and Striessnig, 2003).

potrebbe spiegare la sensibilizzazione/attivazione del sistema trigeminovascolare. Si osserva inoltre un'up-regolazione delle metallo-proteasi (Gursoy-Ozdemir et al., 2004), che possono agire sulla barriera ematoencefalica indebolendola, e alterazioni nell'espressione di molti altri geni (per esempio COX2, NO sintasi) che sono anch'essi implicati in processi di stress ossidativi e infiammazione (Parson, 2004; Sanchez-del-Rio and Reuter, 2004). Il meccanismo che scatena la CSD è ancora oggetto di discussione, anche se le più recenti scoperte sembrano far propendere per una condizione di ipereccitabilità corticale.

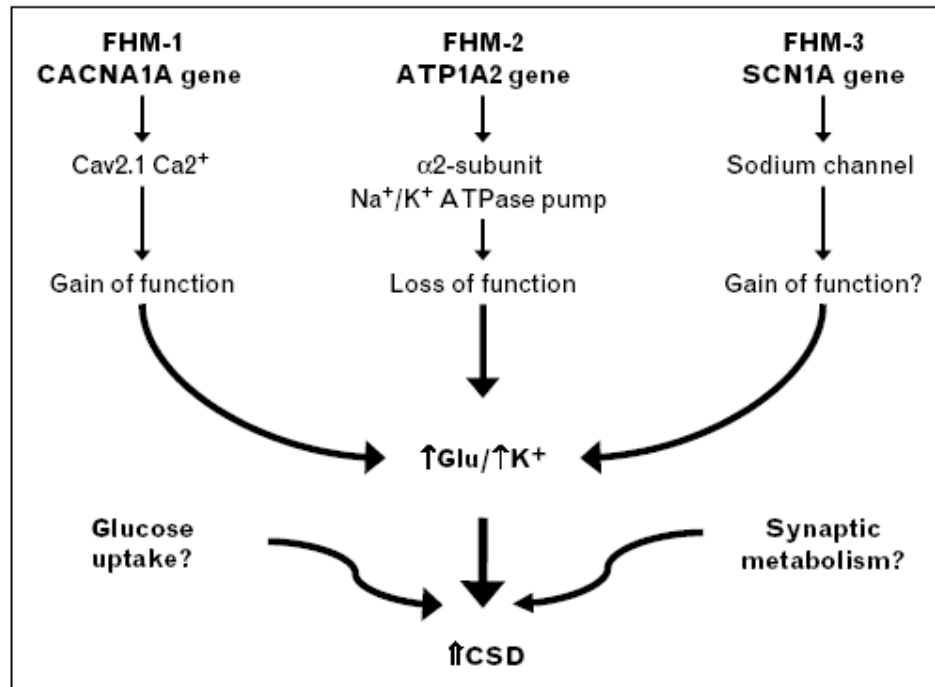
L'FHM è una variante grave e rara dell'emicrania con aura, caratterizzata da emiparesi durante gli attacchi (Pietrobon and Striessnig, 2003; Kors et al., 2004). L'aura in questo tipo

Durante il fenomeno della "*cortical spreading depression*" (Fig.18) si verificano dei cambiamenti nella composizione del fluido extracellulare nella corteccia di ratto che consistono essenzialmente in un incremento nella concentrazione di: glutammato, ioni K<sup>+</sup>, ioni H<sup>+</sup>, NO, acido arachidonico e prostaglandine (Somjen, 2001). Molte di queste sostanze sono in grado di esercitare un'azione pro-infiammatoria, il che

<sup>39</sup> Aura: è costituita da semplici fenomeni sensoriali (allucinazioni uditive o olfattive, lampi di luce, vertigini) o da esperienze complesse di natura particolare e rappresenta il primo segno dell'emicrania (o della crisi epilettica) essendo dovuta all'attività elettrica anomala di un gruppo di neuroni.



di emicrania si manifesta con debolezza motoria, sintomi visivi, somatosensoriali o disfasici. Circa il 20% dei pazienti mostra anche sintomi cerebellari permanenti quali atassia cerebellare progressiva e/o nistagmo<sup>40</sup>. L'emicrania emiplegica familiare è stata classificata in tre tipologie in base ai geni che presentano le mutazioni responsabili della sua insorgenza.



**Fig.18:** Le mutazioni FHM rendono il cervello più suscettibile a prolungata “cortical spreading depression” causata da un eccessivo rilascio sinaptico di glutammato (tipo 1), o da una diminuita rimozione di glutammato e potassio dalla tasca sinaptica (tipo 2), o dalla facilitazione del *firing* ad alta frequenza (tipo 3). Altri geni candidati potrebbero alterare l’introduzione di glucosio o il metabolismo sinaptico. In tutti i casi l’effetto finale è quello di indurre una condizione di ipereccitabilità (Sanchez-del-Rio et al., 2006).

Nella FHM di tipo 1 le mutazioni sono a carico del gene CACNA1A che codifica per la subunità α del canale neuronale voltaggio dipendente del calcio Ca<sub>v</sub>2.1 (conosciuto anche come canale del Ca<sup>2+</sup> di tipo P/Q). Mutazioni di questo canale possono anche causare atassia episodica di tipo 2 (EA2) o atassiaspinocerebellare di tipo 6 (SCA6). Ca<sub>v</sub>2.1 ha una localizzazione preferenzialmente somato-dendritica ed è implicato nel rilascio di neurotrasmettitori. Le mutazioni fino ad oggi descritte provocano una “gain of function” del canale, abbassandone la soglia di attivazione. La “gain of function” dei canali mutanti Ca<sub>v</sub>2.1 può generare un ciclo a feed-back positivo implicato nell’inizio della CSD. Infatti a causa delle mutazioni sono sufficienti anche limitati aumenti della concentrazione extracellulare locale di K<sup>+</sup> per far attivare i canali Ca<sub>v</sub>2.1 e questo determina un rilascio di glutammato che a sua volta provvede ad attivare i recettori post-sinaptici NMDA. Un eccessivo rilascio di

<sup>40</sup> Nistagmo: rapido e ritmico movimento involontario dell’occhio.

glutammato  $\text{Ca}_v2.1$  dipendente comporta una eccessiva attivazione dei recettori post-sinaptici NMDA, quindi un'ulteriore depolarizzazione con conseguente ulteriore aumento della concentrazione di  $\text{K}^+$  extracellulare e così via. La CSD si innesca nel momento in cui i meccanismi che si occupano del *re-uptake* di  $\text{K}^+$  extracellulare non sono più in grado di contenere il suo aumento di concentrazione, causato da questo ciclo a *feed-back* positivo.

Nelle FHM di tipo 2 le mutazioni sono localizzate sul gene ATP1A2 che codifica per la subunità  $\alpha 2$  della pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasi, la quale trasporta attivamente contro gradiente gli ioni  $\text{Na}^+$  verso l'esterno e gli ioni  $\text{K}^+$  verso l'interno della cellula. Essa svolge un ruolo fondamentale per il mantenimento del potenziale di membrana a riposo e del corretto volume cellulare e fornisce la “*driving force*” per il trasporto di sostanze nutritive e neurotrasmettitori. Inoltre le  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasi neuronali e gliali sono importanti per il riassorbimento sia del  $\text{K}^+$  extracellulare, liberato durante la propagazione dei potenziali d'azione, che del glutammato. Quest'ultimo infatti viene rimosso dallo spazio intersinaptico attraverso trasporto attivo guidato da gradienti di  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ . Le mutazioni identificate nel gene ATP1A2 causano o una completa perdita di funzione o una ridotta affinità della pompa per il  $\text{K}^+$ , compromettendo così la sua rimozione dallo spazio extracellulare. Nei soggetti affetti, a causa dell'alterato meccanismo di *re-uptake*, una debole depolarizzazione può provocare un incremento della concentrazione di  $\text{K}^+$ , che raggiungendo il livello critico scatenerrebbe la CSD.

Le FHM di tipo 3 sono dovute a mutazioni nel gene SCN1A (Dichans et al., 2005; Gargus and Tournary, 2007; Vanmolkot et al., 2007). I primi studi di questi mutanti sono stati effettuati sull'isoforma cardiaca  $\text{Na}_v1.5$ , più facile da utilizzare rispetto a  $\text{Na}_v1.1$ , sebbene tra queste due isoforme ci siano diverse differenze strutturali e funzionali (Fozzard and Hanck, 1996; Richmond et al., 1998; Mantegazza et al., 2001; Catterall et al., 2005).

La mutazione Q1478K è situata nel *linker* citoplasmatico tra i domini III e IV, una porzione del canale coinvolta nei processi di inattivazione veloce. L'introduzione della mutazione nell'isoforma  $\text{hNa}_v1.5$  e l'espressione del canale mutante in cellule tsA-201 hanno evidenziato un accelerato recupero dall'inattivazione (Dichans et al., 2005), il che potrebbe indurre una maggiore velocità di *firing* nei neuroni. Questo eccessivo *firing* potrebbe facilitare l'inizio e la propagazione della CSD attraverso un incremento tanto della concentrazione extracellulare di  $\text{K}^+$ , quanto del glutammato rilasciato. Anche la mutazione L1649Q, che si trova nel segmento S4 del dominio IV, è stata ingegnerizzata nell'isoforma  $\text{hNa}_v1.5$  e studiata in cellule tsA-201. Questa mutazione induce una più lenta inattivazione, uno spostamento depolarizzante di circa 10 mV della curva di voltaggio dipendenza dell'inattivazione e un accelerato recupero dall'inattivazione veloce (Vanmolkot et al., 2007).

Si tratta anche in questo caso di alterazioni che creano una condizione di ipereccitabilità, conducendo dunque ad un aumentato rilascio di glutammato e  $K^+$ , il che stimolerebbe l'inizio della CSD.

Nel 2008 Cestèle et al. hanno ingegnerizzato la mutazione, Q1478K, nell'isoforma umana  $Na_v1.1$  e hanno condotto degli studi di caratterizzazione in cellule tsA201 e in colture di neuroni. Gli autori hanno osservato che gli effetti di questa mutazione influenzano le proprietà di *gating* del canale; in alcuni casi questi effetti sono consistenti con una condizione di ipoeccitabilità, in altri di ipereccitabilità. La simulazione del *firing* neuronale preceduta da lunghi impulsi depolarizzanti che mimano le condizioni di pro-emicrania hanno rivelato che l'effetto di questa mutazione è una *gain of function*, che coincide con un aumentato *firing* neuronale. Tuttavia, durante le scariche ad alta frequenza e le lunghe depolarizzazioni, l'effetto mostra una *loss of function*. L'effetto finale è un'iniziale aumentata capacità di sostenere scariche neuronali ad alta frequenza che tuttavia è limitata nel tempo, poiché gli effetti delle modificazioni che favoriscono la *loss of function* diventano dominanti durante la scarica. Questa ipereccitabilità autolimitata potrebbe essere una caratteristica specifica delle mutazioni che causano emicrania, capaci sia di promuovere una cascata di eventi che portano all'emicrania sia di prevenire lo sviluppo verso un'ipereccitabilità estrema tipica delle crisi epilettiche (Cestèle et al., 2008).

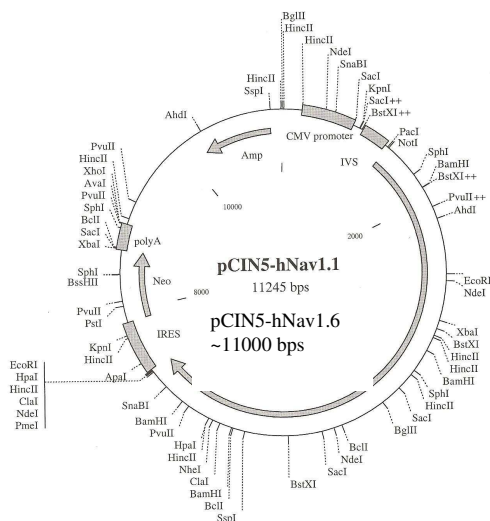
Nel 2009 anche il gruppo di Kahlig et al. ha ingegnerizzato in  $Na_v1.1$  le mutazioni precedentemente caratterizzate in  $Nav1.5$ , Q1478K e L1649Q, e la mutazione L263V, a carico di un residuo altamente conservato nel segmento V del dominio I. Lo studio in tsA201 ha rivelato che la mutazione L1649Q causa una *loss of function* del canale; la mutazione Q1478K, a conferma dei risultati di Cestèle et al., ha effetti contrapposti che portano sia a *gain* (aumentata corrente persistente) che *loss of function* (incremento inattivazione lenta e ritardato recupero dall'inattivazione veloce) del canale; infine, la mutazione L263V produce diversi effetti sul *gating* del canale che portano a *gain of function*.

## MATERIALI E METODI

## Colture cellulari e trasfezioni

Lo studio di canali ionici viene spesso effettuato in sistemi di espressione eterologa (non-neuronali) che presentano piccole o inesistenti correnti endogene. Questi sistemi di espressione sono relativamente facili da utilizzare e permettono un veloce *screening* di mutanti. Per i nostri studi abbiamo adottato come sistema di espressione eterologa le cellule tsA201, un subclone delle HEK293 (*Human Embryonic Kidney*). Queste cellule esprimono il “*large T antigen*” di SV40, una proteina virale che induce la replicazione di plasmidi contenenti l’origine di replicazione per SV40, che permette, nel caso vengano utilizzati tali vettori, un’espressione massiva di proteine esogene. Queste cellule sono state usate per entrambi i progetti. I vantaggi del loro utilizzo comprendono la facilità con cui queste cellule vengono mantenute in coltura e trasfettate con elevata efficienza, con metodi estremamente economici (elettroporazione, uso di lipofectamina o di calcio-fosfato). Inoltre il mantenimento del *background* cellulare di mammifero consente fedeltà nell’espressione e nel processamento delle proteine. Infine queste cellule sono relativamente facili da utilizzare in esperimenti di elettrofisiologia; infatti le loro dimensioni limitate e la mancanza di processi cellulari consentono un’imposizione veloce ed accurata del potenziale di membrana desiderato. Nell’ambito del progetto finalizzato a valutare l’effetto di mutanti tronchi di Na<sub>v</sub>1.1 sulla funzionalità dell’isoforma Na<sub>v</sub>1.6, è stata invece utilizzata una linea di HEK 293T che esprime in maniera stabile questo canale (generosamente donate dal professor Enzo Wanke, Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze, Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali dell’Università degli Studi di Milano).

Entrambe le linee cellulari sono mantenute in coltura in un incubatore a 37°C in presenza del 5% di CO<sub>2</sub>. Il terreno di coltura utilizzato per le cellule tsA201 è composto da D-MEM F12 con Glutamax (un analogo stabilizzato della glutammina), 10% di FBS (*foetal bovine serum*) e 1% di penicillina-streptomicina. Il terreno di coltura utilizzato per le cellule HEK 293T esprimenti in maniera costitutiva Na<sub>v</sub>1.6 è composto da D-MEM con Glutamax, 1% di penicillina-streptomicina, 10% FBS, Gln 2mM, aminoacidi non-essenziali all’1% e G418 allo 0.1%. Il G418 è un antibiotico selettivo con struttura simile a quella della gentamicina B1, che inibisce la sintesi proteica sia in procarioti che eucarioti; il vettore pCIN5 (Fig 1) contiene, oltre al gene per Na<sub>v</sub>1.6, il gene neo da Tn5 che gli permette di indurre resistenza a tale antibiotico, che è quindi utilizzabile per la selezione delle cellule esprimenti il vettore pCIN5 nel caso si voglia generare una linea cellulare ad espressione stabile



**Fig.1: schematizzazione del vettore pCIN5-**

- Una sequenza enhancer-promotrice di CMV (citomegalovirus), per un'espressione costitutiva del target a livelli elevati;
- Il gene codificante h Nav1.6;
- Il gene *amp* per la resistenza ad ampicillina e il gene *neo* per la resistenza a G418.
- La sequenza poly A.

Le cellule vengono mantenute in linea fino al passaggio P35 circa, stadio in cui cominciano a mostrare una diminuita efficienza di transfezione e in cui risultano più instabili durante le registrazioni elettrofisiologiche. Il loro “stato di salute” viene comunque continuamente monitorato attraverso l’osservazione della morfologia e valutando eventuali cambiamenti nella rapidità di divisione cellulare.

Le cellule vengono transfettate, dopo aver raggiunto una densità del 70-80% circa, utilizzando una procedura basata sulla formazione di cristalli di calcio fosfato. Le reazioni di transfezione vengono effettuate in petri da 3.5 cm di diametro; il volume di transfezione utilizzato è di 166 µl e la quantità di DNA da transfettare è di circa 2-3 µg. Si preparano due provette identificate con le lettere A e B. Nella provetta A si introducono 83 µl del buffer fosfato HBS 2X, mentre nella provetta B si introducono x µl dei cDNA di interesse, 8.3 µl di CaCl<sub>2</sub> 10X, e i µl di H<sub>2</sub>O necessari per arrivare ad un volume di 83 µl. Il contenuto della provetta B viene versato, goccia a goccia, nella provetta A mantenuta nel frattempo in leggera agitazione. Si lasciano trascorrere 5 minuti per assicurare la formazione dei cristalli di CaPO<sub>4</sub> ai quali è associato il DNA plasmidico (coprecipitazione) e si versa il volume totale di reazione (166 µl) nella petri da transfettare, alla quale è stato precedentemente sostituito il terreno di coltura. Infine, attraverso un movimento a croce, si assicura una distribuzione omogenea della reazione di transfezione. Le cellule transfettate vengono lasciate in incubazione a 37°C per 4 ore e, dopo aver verificato la presenza di cristalli di CaPO<sub>4</sub>, vengono sottoposte a dei lavaggi e poi staccate con PBS+EDTA (l’EDTA è un chelante di Ca<sup>2+</sup> e del Mg<sup>2+</sup> indispensabili per l’adesione cellulare mediata dalle integrine, che viene usato frequentemente per staccare le cellule dalle petri nel caso in cui si vogliano studiare

proteine di membrana). Infine, dopo averle diluite opportunamente vengono ripiastrate. La diluizione e il successivo ripiastramento sono finalizzati all'ottenimento di petri contenenti cellule isolate, prerequisito basilare per poter effettuare registrazione elettrofisiologiche. Queste ultime vengono condotte 24/48 ore dopo l'avvenuta transfezione.

Per caratterizzare i mutanti hNa<sub>v</sub>1.1Y790C, hNa<sub>v</sub>1.1R859C, hNa<sub>v</sub>1.1M956T, hNa<sub>v</sub>1.1W1204R, hNa<sub>v</sub>1.1R1245Q, hNa<sub>v</sub>1.1V1366I e hNa<sub>v</sub>1.1M1653K le cellule tsA201 sono state transfettate con 2 µg di subunità  $\alpha$  da sola (pCDM8-hNa<sub>v</sub>1.1 o pCDM8-hNa<sub>v</sub>1.1 mutante) o con 1 µg di subunità  $\beta$ 1 (h $\beta$ 1-IRES YFP).

Per esaminare l'azione di chaperoni chimici o farmacologici, le sostanze (SIGMA) sono state aggiunte al terreno dopo la transfezione alle seguenti concentrazioni: 100µM per la fenitoina (PHT), 100µM per la carbamazepina (CBZ), 100µM per il topiramato (TPM), 30µM per il valproato (VPA), 100µM per la veratridina (VER). Dopo 48 ore di trattamento con lo chaperone, si è provveduto a sostituire il terreno e quindi ad eseguire le registrazioni elettrofisiologiche.

Per lo studio relativo ai mutanti tronchi, le cellule tsA201 sono state trasfettate con 2 µg di pCDM8-hNa<sub>v</sub>1.1 o di pCDM8-hNa<sub>v</sub>1.2 da solo o con 1µg di IRES YFP-hNa<sub>v</sub>1.1R1234X o di IRES YFP- hNa<sub>v</sub>1.1R222X. Le cellule HEK293 esprimenti stabilmente hNa<sub>v</sub>1.6 sono state trasfettate con 1µg di IRES YFP- hNa<sub>v</sub>1.1R1234X o di IRES YFP-hNa<sub>v</sub>1.1R222X.

## **Mutagenesi**

I costrutti mutanti sono stati realizzati attraverso PCR di mutagenesi, avvalendosi del kit Quick Change XL Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). La tecnica prevede il disegno di una coppia di primer che non siano perfettamente complementari al template ma che presentino delle basi discordanti corrispondenti alle basi mutate che si desidera introdurre. I primer, della lunghezza di 25-35 paia di basi, vengono disegnati in modo che le basi mismatching risultino al centro e siano fiancheggiati da sequenze perfettamente complementari così da garantire una sufficiente stabilità di appaiamento al template. La PCR viene condotta utilizzando una polimerasi ad alta fedeltà che replica il DNA dell'intero plasmide contenente il cDNA del costrutto che si intende mutagenizzare. La fase di amplificazione della reazione di PCR viene limitata ad un numero modesto di cicli (18 cicli)

per evitare l'incorporazione di mutazioni indesiderate nel cDNA di interesse. Al termine della reazione, il prodotto di PCR viene trattato con l'enzima DpnI, il quale degrada il DNA metilato. Essendo le metilazioni introdotte solo in seguito all'azione di metilasi batteriche, attraverso l'attività dell'enzima si verifica teoricamente la degradazione di tutto il template wild type. A questo punto un'aliquota della reazione viene usata per trasformare l'appropriato ceppo batterico (TOP10/P3 per il plasmide pCDM8, TOP10 per il plasmide IRES YFP) e le colonie cresciute vengono screenate tramite sequenziamento del DNA plasmidico da esse estratto.

Le mutazioni missenso (sostituzione di un aminoacido) di hNa<sub>v</sub>1.1 sono state introdotte sul plasmide pCDM8-hNa<sub>v</sub>1.1 utilizzando i *primers*:

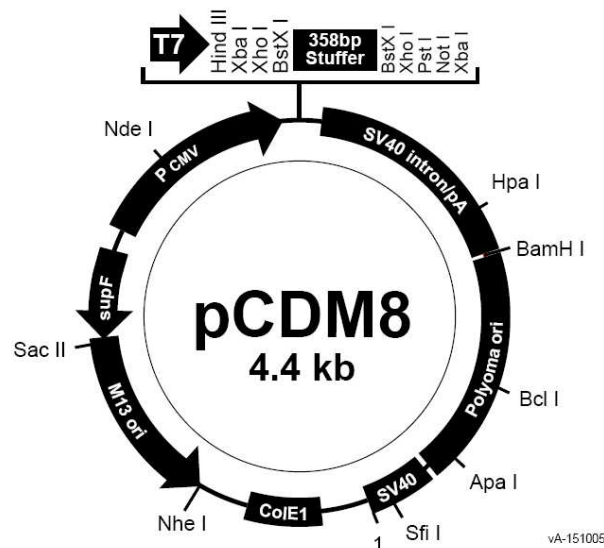
- 5'CATGGAGCACTGTCCAATGACGGACC forward e  
5'GTCCGTCATTGGACAGTGCTCCATG reverse per il mutante Y790C;
- 5'GATTATCTGTTCTCTGTTTCATTTTCG forward e  
5'CGAAATGAACAGAGAACAGATAATC reverse per il mutante R859C;
- 5'ATAGAGACCACGTGGGACTGTATG forward e  
5'ACAGTCCCACGTGGTCTCTATCC reverse per il mutante M956T;
- 5'GGAAAACAACGGTGGAACTGAGAAG forward e  
5'AGGTTCCACCGTTGTTTTCTCTGCC reverse per il mutante W1204R;
- 5'ATTGATCAGCAAAAGACGATTAAG forward e  
5'CTTAATCGTCTTTTGCTGATCAATA reverse per il mutante R1245Q;
- 5'GCATCATGGGCATAAATTTGTTTGC forward e  
5'GCAAACAAATTTATGCCCATGATGC reverse per il mutante V1366I;
- 5'TCTTTGCTTTGAAGATGTCCCTTC forward e  
5'GGGACATCTTCAAAGCAAAGAGCAG reverse per il mutante M1653K.

Il vettore di espressione pCDM8 (Fig.2) viene comunemente utilizzato per l'espressione di geni in cellule eucariotiche. Questo vettore consente un'espressione transiente elevata della proteina *target*, incluse le proteine citoplasmatiche, fattori trascrizionali, proteine virali, recettori di superficie e proteine secretorie. Gli elementi principali di questo vettore sono:

- Una sequenza *enhancer*-promotrice di CMV (citomegalovirus), per un'espressione costitutiva del *target* a livelli elevati;
- L'origine di replicazione per SV40 e per poliovirus, che consentono la replicazione episomale nelle cellule che esprimono il "*large T antigen*" di SV40 o nelle cellule latentemente infettate con il poliovirus;



- Un MCS (multiple cloning site), che consente l'inserzione del gene *target* nel vettore;
- L'origine ColE1 per la crescita nel ceppo batterico *E.coli* e *supF*, un soppressore di tRNA necessario per il mantenimento negli *strain* di *E.coli* che esprimono l'episoma P3. P3 è un plasmide di circa 60 kb che porta la resistenza per canamicina, tetraciclina, e ampicillina. Il gene per la canamicina è sempre attivo, e conferisce ai batteri con P3 la resistenza a questo antibiotico. Invece i geni per tetraciclina e ampicillina presentano la mutazione amber che li rende inattivi durante la normale crescita e replicazione dei batteri. In seguito alla trasformazione con vettori che esprimono *supF* (come pCDM8), le mutazioni amber in nei geni per tetraciclina e ampicillina nel plasmide P3 sono soppresse, e i batteri diventano resistenti a questi antibiotici;
- La sequenza segnale per la poliadenilazione (poly A) di SV40, che consente l'aggiunta della tipica sequenza poliadenilica all'estremità 3'-OH del pre-mRNA.



**Fig 2. schematizzazione del vettore pCDM8.** Il vettore contiene, un CMV, un MCS, un origine di replicazione per SV40 e per polioma, la sequenza di poliadenilazione di SV40, il gene *supF* e il gene per la replicazione in *E.coli*.

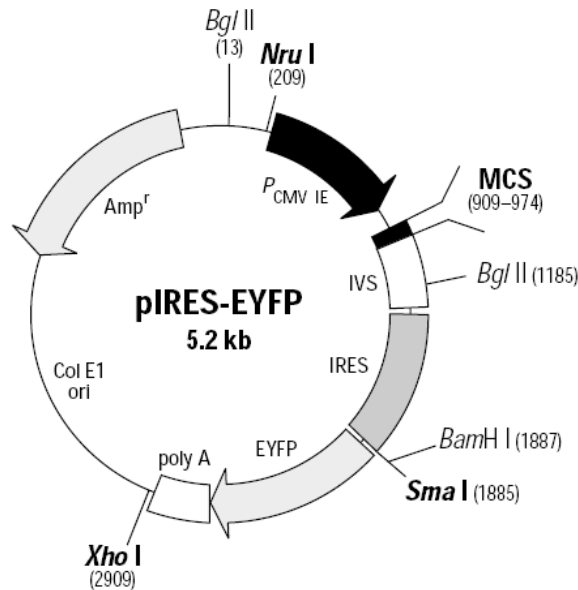
Le mutazioni nonsense (introduzione di un codone di stop) di hNa<sub>v</sub>1.1 sono state invece introdotte sul plasmide IRES YFP-hNa<sub>v</sub>1.1 (fig.3) N-terminale (cioè contenente solo una porzione N-terminale della sequenza codificante di Na<sub>v</sub>1.1 ) utilizzando i *primers*:

- 5'CAGAGTTCTCTGAGCATTGAAG forward e  
5'CTTCAATGCTCAGAGAACTCTGAA reverse per il mutante R222X;

- 5'TATATTGATCAGTGAAAGACGATTAAG forward e  
5'CTTAATCGTCTTTCACTGATCAATA reverse per il mutante R1234X.

IRES YFP è un vettore di espressione bicistronico, che permette l'espressione sia del gene d'interesse che del gene reporter YFP in cellule di mammifero. Gli elementi principali di questo vettore sono:

- La sequenza *enhancer*-promotrice di CMV;
- L'MCS;
- Un IRES (internal ribosome entry site) di encephalomyocarditis virus (ECMV), tra l'MCS e il gene che codifica la YFP (yellow fluorescent protein), la proteina *reporter*;
- L'origine ColE1 per la crescita per la crescita in E.coli;
- La sequenza poly A;
- Il gene per la resistenza all'ampicillina.



**Fig 3. schematizzazione del vettore pIRES-EYFP.** Il vettore contiene, un CMV, un MCS, un IRES, il gene reporter, la sequenza di poliadenilazione e l'origine per la replicazione in E.coli.

Essendo il cDNA di hNa<sub>v</sub>1.1 facilmente soggetto a fenomeni di riarrangiamento, come tutti i cloni umani dei canali del sodio voltaggio dipendenti, per ridurre il rischio, i batteri (ceppo usato: TOP10/P3) sono stati propagati alla temperatura di 28°C per 48 ore. Inoltre il cDNA estratto è stato interamente sequenziato dopo ogni propagazione per monitorare l'eventuale introduzione di mutazioni spurie.

## Creazione di costrutti chimerici e subclonaggi

Per gli esperimenti relative alla caratterizzazione dei mutanti tronchi, l'N-terminale di hNa<sub>v</sub>1.1 è stato subclonato nel vettore IRES YFP. Il vettore pCIN5 hNa<sub>v</sub>1.1 è stato digerito con EcoRV e NotI e il frammento ottenuto, di circa 1000 bp, è stato ligato al vettore IRES YFP, digerito precedentemente con gli stessi enzimi.

Il plasmide pSP64T-hβ1 (che codifica per la subunità β1 del canale del sodio voltaggio-dipendente) è stato fornito dal Dr. Al George (Vanderbilt University, Nashville, TN). Per esprimere nello stesso plasmide sia la subunità β1 che la *cyan fluorescent protein* (CFP) come *reporter*, il cDNA della prima è stato subclonato nel vettore di espressione bicistronico pIRES-CFP (Clontech, Palo Alto, CA). Abbiamo subclonato hβ1 usando come siti di restrizione NotI e EcoRI, ottenendo il vettore bicistronico pIRES-CFP-β1.

Il cDNA codificante per la calmodulina di ratto (rCAM) è stato trasferito dal vettore pJPA7 al vettore pIRES-CFP (Clontech). La sequenza codificante della calmodulina è stata amplificata mediante PCR utilizzando i seguenti primers:

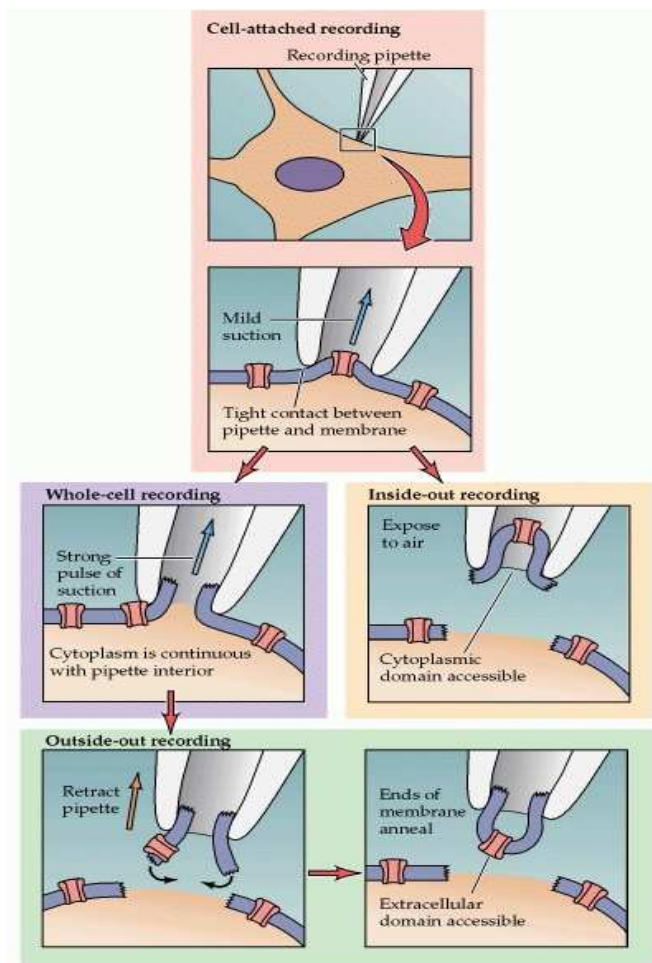
- 5'ctctccacaGAtatccactccag in maiuscolo le basi che introducono il sito per EcoRV)
- 5' ggccatggcgccGCcgattgaat (in maiuscolo le basi che introducono il sito per NotI)

L'amplificato di PCR è stato digerito con gli enzimi EcoRV e NotI e subclonato nel vettore pIRES-CFP tagliato con i medesimi enzimi.

## Elettrofisiologia

Il *voltage clamp*, introdotto nel 1949, è un metodo che mantiene costante il potenziale di membrana delle cellule ma nello stesso tempo permette di misurare le correnti che le attraversano, rendendo così possibile lo studio dell'attività dei canali ionici. Quando il potenziale di membrana è bloccato i canali voltaggio dipendenti sono ancora in grado di aprirsi e chiudersi in risposta a variazioni imposte del potenziale di membrana, ma il sistema di blocco impedisce che le modificazioni delle correnti di membrana conseguenti all'attività dei canali abbiano influenza sul potenziale di membrana stesso. Il sistema classico che consente di mantenere il potenziale di membrana invariato si basa sull'azione concertata di due elettrodi, inseriti nella cellula. Uno dei due elettrodi misura il valore del potenziale di membrana che viene confrontato con un valore di riferimento (potenziale di comando che si vuole imporre alla cellula); la differenza tra i due valori viene utilizzata per produrre un

segnale di corrente che viene poi fornito alla cellula e, scorrendo attraverso la membrana produce una differenza di potenziale che porta il valore del potenziale di membrana al valore voluto. Se, per esempio, il potenziale di membrana imposto determina l'attivazione dei canali del  $\text{Na}^+$ , ne deriverà un ingresso di ioni  $\text{Na}^+$  che tende a depolarizzare la membrana. La variazione del potenziale che ne conseguirebbe viene però pressoché istantaneamente cancellata grazie a questo sistema che introduce nella cellula una identica quantità di ioni negativi. Inoltre il sistema è strutturato in modo tale che le correnti introdotte dal secondo elettrodo vengano registrate, il che consente di misurare l'esatto flusso di corrente che si verifica ad un certo voltaggio. La possibilità di registrare le correnti che fluiscono attraverso un singolo canale si è concretizzata con l'avvento della tecnica del *patch clamp*. Il *patch clamp*, introdotto nella seconda metà degli anni settanta da E. Neher e B. Sakmann, si basa su una modificazione della tradizionale modalità di registrazione con micropipette in vetro. In questo metodo una micropipetta con una punta del diametro di 1-2  $\mu\text{m}$  viene posta a stretto contatto con la membrana cellulare e viene poi applicata una leggera suzione, il che porta alla formazione di una saldatura ad alta resistenza (nell'ordine dei  $\text{G}\Omega$ ) tra la pipetta e la superficie cellulare. Questa stretta saldatura e l'ausilio di strumentazioni elettroniche sempre più sensibili permettono di misurare le correnti che contraddistinguono i singoli canali contenuti in quel tassello (*patch*) di membrana racchiuso tra i bordi della micropipetta. Le registrazioni possono essere condotte in diverse configurazioni: 1) *on-cell* o *cell-attached*, quando la pipetta è fusa con una piccola porzione di membrana, 2) *whole cell*, quando applicando una ulteriore suzione si rompe il tassello di membrana sotteso alla punta della pipetta e si possono così registrare le correnti relative all'intera cellula, 3) *inside out* e *outside out*, quando il tassello di membrana viene staccato dal resto della cellula, pur rimanendo saldato alla pipetta, e può così essere messo a contatto con svariate soluzioni test (fig. 4).



**Fig.4: Schematizzazione della tecnica del patch-clamp, in configurazione cell-attached, whole cell e inside-out.** Nel pannello in alto è raffigurata la configurazione *cell-attached*, dove la pipetta è fusa con una piccola porzione di membrana, permettendo di registrare le correnti dei canali presenti in quel *patch* di membrana. Da questa configurazione, applicando un'ulteriore suzione che porta alla rottura del tassello di membrana sotteso alla punta della pipetta, si può passare alla configurazione *whole cell*, rappresentata nel pannello sottostante di sinistra, che permette invece di registrare le correnti relative all'intera cellula. Dalla configurazione *whole cell* infine si può passare all'*outside out* (pannelli in basso), dove il tassello di membrana viene staccato dal resto della cellula, pur rimanendo saldato alla pipetta. Anche nella configurazione *inside out* (nel pannello sottostante di destra) il tassello di membrana rimane saldato alla pipetta e permette di modificare l'ambiente della membrana cellulare interna esponendola alla soluzione esterna.

Nel nostro caso sono state realizzate registrazioni di *voltage clamp* in configurazione *whole cell*. La composizione della soluzione extracellulare (pH=7.4) è la seguente: NaCl (Sigma) 140mM,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Sigma) 2mM,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Sigma) 2mM, Hepes (Sigma) 10mM. La composizione della soluzione intracellulare (pH=7.4) è la seguente: N-Metil-D-Glucamina (Sigma) 195mM, NaCl (Sigma) 10mM,  $\text{MgCl}_2$  (Sigma) 4mM, EGTA (Sigma) 5mM, Hepes (Sigma) 10mM.

Le registrazioni sono state eseguite a temperatura ambiente usando un amplificatore Axopatch 1D (Axon Instruments, Union City, CA) con il software PCLAMP 6 (Axon Instruments).

Sono stati applicati i protocolli per la caratterizzazione dei processi di attivazione, inattivazione e recupero dall'inattivazione delle correnti di sodio generate dai canali voltaggio dipendenti  $\text{hNa}_v1.1$  (*wild type* o mutante),  $\text{hNa}_v1.2$  o  $\text{hNa}_v1.6$  in assenza o in presenza di proteine accessorie.

Per studiare l'attivazione, partendo da un potenziale di *holding* di  $-100$  mV, sono stati somministrati alla cellula degli impulsi depolarizzanti successivi. Ogni impulso presenta un valore di potenziale che risulta essere di 5 mV più depolarizzato rispetto al precedente e questi impulsi vengono forniti fino ad arrivare ad un valore di potenziale somministrato pari a  $+30$  mV. All'applicazione di ogni impulso è associata la registrazione delle correnti di sodio

che fluiscono attraverso la membrana cellulare. I valori dell'intensità di corrente possono essere utilizzati per costruire la curva I-V, in cui l'intensità di corrente è espressa in funzione del potenziale applicato, o la curva di voltaggio dipendenza dell'attivazione, attraverso la quale si descrive come varia la conduttanza in funzione del potenziale applicato. La conduttanza viene calcolata a partire dai valori di intensità di corrente applicando la legge generalizzata di Ohm:  $G = I / (V_m - V_x)$ , in cui I è il valore del picco della corrente di  $\text{Na}^+$  misurata sperimentalmente,  $V_m$  il potenziale applicato,  $V_x$  il potenziale di equilibrio dello ione  $\text{Na}^+$ . Le conduttanze vengono infine normalizzate, dividendole per il valore massimo.

Per studiare l'inattivazione si adotta un protocollo simile, ossia si forniscono degli impulsi depolarizzanti partendo da un potenziale di *holding* di -100 mV fino a raggiungere un potenziale di +30 mV. Ogni impulso determina l'apertura ma anche l'inattivazione dei canali, in funzione dell'entità della depolarizzazione. Ogni impulso depolarizzante in questo protocollo è seguito da un impulso a 0 mV, che costituisce il potenziale di test al quale si registrano i valori di corrente. Tanto maggiore sarà stata l'entità della depolarizzazione precedentemente somministrata, tanto maggiore sarà il numero di canali inattivato e quindi tanto minore sarà la quantità di corrente registrata al potenziale di test. Le intensità delle correnti misurate a 0 mV e normalizzate al valore massimo, espresse in funzione del potenziale applicato costituiscono la curva di voltaggio dipendenza dell'inattivazione. Sia per l'attivazione che per l'inattivazione, ai punti sperimentali normalizzati sono state adattate, per mezzo di un algoritmo di regressione non lineare, delle relazioni di Boltzmann  $y = 1 / \{1 + \exp [(V - V_{1/2})/k]\} + A$ , dove y è la conduttanza del  $\text{Na}^+$  normalizzata oppure l'intensità di corrente di  $\text{Na}^+$  normalizzata, A la linea di base, V il potenziale di membrana,  $V_{1/2}$  il potenziale di semi-attivazione ( $V_a$ ) o semi-inattivazione ( $V_h$ ) e k un fattore di pendenza (in mV).

Il recupero dall'inattivazione veloce è stato studiato fornendo un pre-pulso della durata di 100 msec a 0 mV, seguito un ritorno per tempi crescenti al potenziale di *holding* e infine dall'applicazione del potenziale di test (0 mV) al quale si registrano le correnti. La funzione del pre-pulso depolarizzante è quella di indurre inattivazione nei canali, i quali poi hanno la possibilità di uscire dallo stato inattivato, e quindi manifestare corrente, in funzione del tempo trascorso al potenziale di *holding*. La curva che descrive la cinetica dei recuperi infatti esprime la corrente normalizzata in funzione del tempo (in msec) trascorso al potenziale di *holding*.

Le analisi sono state svolte usando Origin (Microcal Inc.) e pClamp (Axon Instr.). I risultati statistici sono espressi come valor medio  $\pm$  errore standard (SE). Il valore soglia (p) di rilevanza statistica è 0.05. Per confronti statistici abbiamo deciso di utilizzare il t-test, un tipo

di test che può essere utilizzato solo quando la distribuzione dei dati è normale e le osservazioni raccolte in modo indipendente. Il t test viene comunemente utilizzato quando vogliamo sapere se la eventuale differenza fra medie di due campioni di piccole dimensioni (tipici dei dati elettrofisiologici, come ad esempio la media della densità di corrente del canale *wt* e di del canale mutante) è significativa.

# RISULTATI

## progetto “MUTANTI TRONCHI”



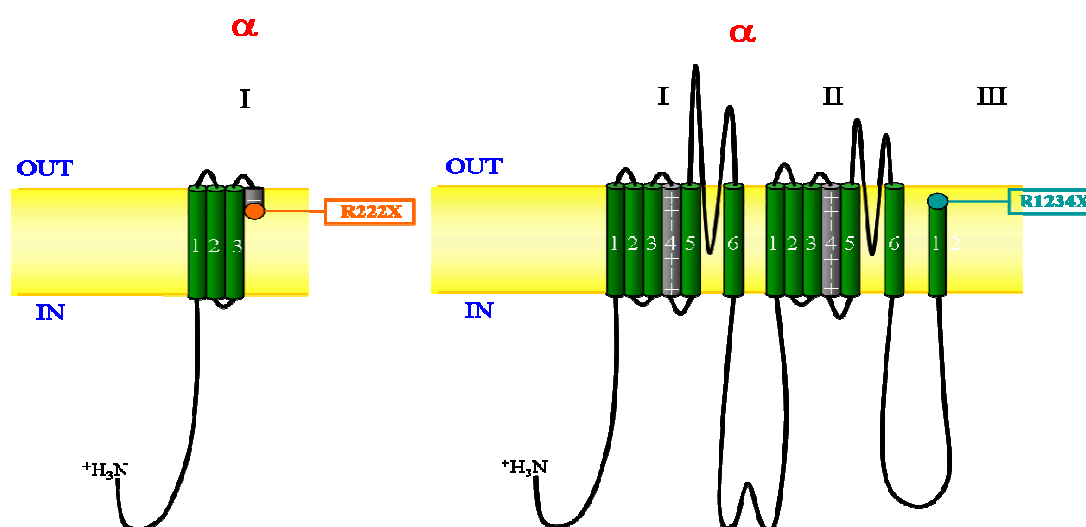
La SMEI (*severe myoclonic epilepsy of infancy*), altrimenti conosciuta come sindrome di Dravet, è un'encefalopatia epilettiforme farmaco-resistente, che insorge intorno al primo anno di vita e si manifesta con crisi generalizzate toniche, cloniche e tonico-cloniche inizialmente indotte da febbre. Successivamente i pazienti sono soggetti anche ad altri tipi di crisi quali mioclonie, crisi di assenza e crisi parziali. Entro due anni dall'insorgenza della malattia, gli affetti vanno incontro a declino mentale e a rallentamento nello sviluppo psicomotorio.

L'80% degli individui affetti da SMEI presenta mutazioni del gene SCN1A, la maggior parte delle quali sono *de novo*. Circa un terzo di queste mutazioni sono missenso; i restanti due terzi sono mutazioni nonsense e *frameshift*, che comportano l'inserzione di siti di stop prematuri che risultano in un canale tronco.

In questo studio abbiamo focalizzato la nostra attenzione su due mutazioni a carico Na<sub>v</sub>1.1, R222X e R1234X (Claes et al., 2001; Nabbout et al., 2003; Fukuma et al., 2004; Oguni et al., 2005; Mancardi et al., 2006; Harkin et al., 2007; Depienne et al., 2009; Löfgren et al., 2010), che comportano la produzione di una proteina tronca. Entrambe le mutazioni sono *de novo*, come la maggior parte delle mutazioni che causano SMEI.

Le mutazioni selezionate comportano le seguenti sostituzioni:

- sostituzione di un'arginina, situata in posizione 222 nella sequenza codificante, con un codone di stop (R222X);
- sostituzione di un'arginina, situata in posizione 1234 nella sequenza codificante, con un codone di stop (R1234X).



**Fig.1: Schematizzazione del canale voltaggio-dipendente del sodio.** I cilindri colorati in verde (e in grigio nel caso dei sensori del voltaggio), rappresentano i segmenti transmembrana ad  $\alpha$ -elica, mentre i numeri romani indicano i domini. La posizione delle mutazioni è segnalata da pallini colorati: in azzurro la mutazione R1234X, in arancione la mutazione R222X.

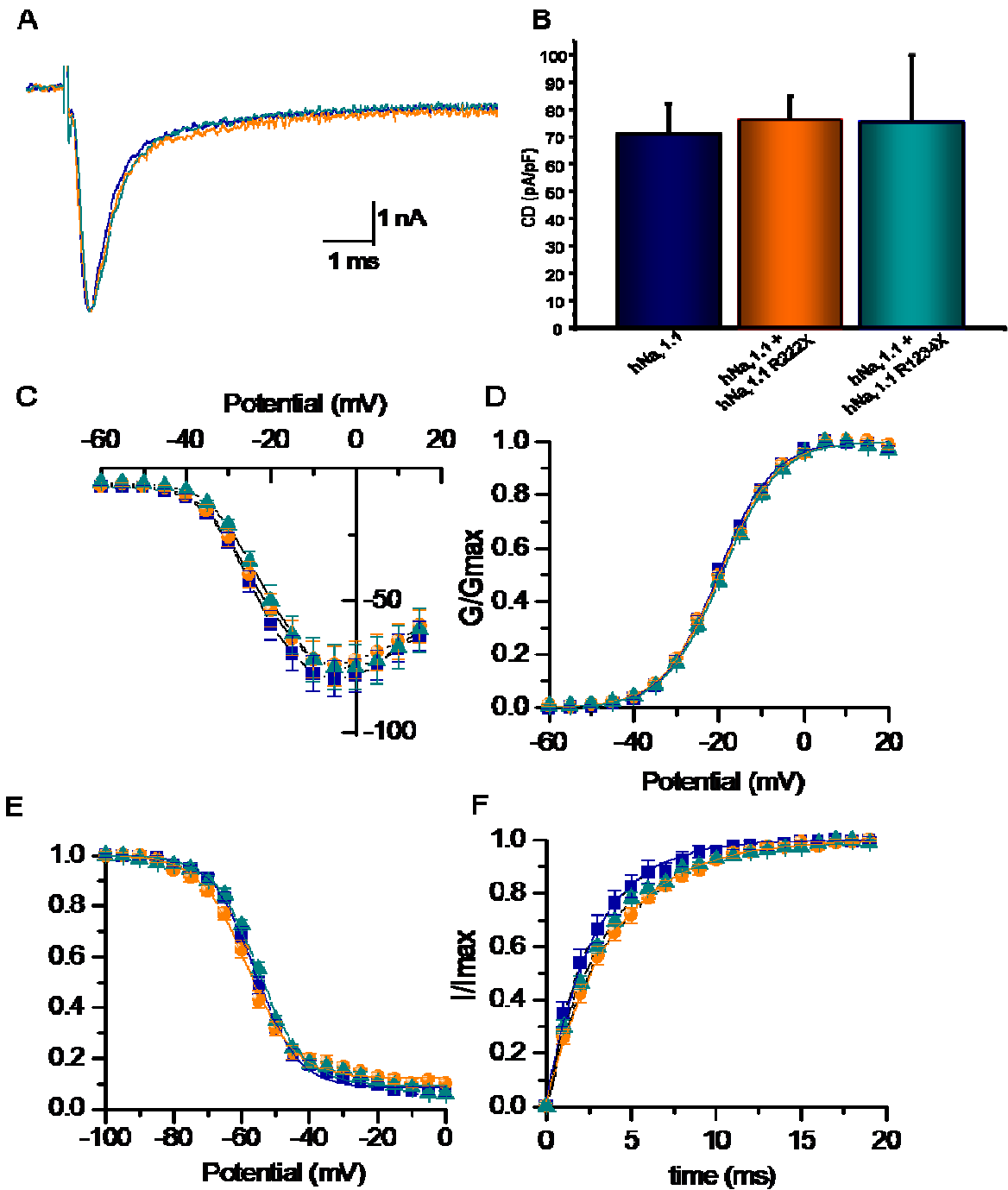
La mutazione R222X porta alla produzione di una proteina che presenta soltanto i primi tre segmenti e parte del segmento 4 del dominio I; la mutazione R1234X, invece, tronca il canale al livello del primo segmento del dominio III (Fig.1).

Il meccanismo patogenetico alla base dello sviluppo della SMEI in presenza di mutazioni tronche di Nav1.1 è, secondo le ipotesi più accreditate, riconducibile alla condizione di aploinsufficienza che ne deriva, cioè alla presenza di bassi livelli di proteina funzionale. Tuttavia, da studi effettuati in un modello murino di SMEI che esprime l'isoforma Nav1.1 tronca, è emerso che la diminuzione di corrente osservata negli interneuroni di topi etero- ed omo-zigoti non è lineare (Yu et al., 2006); questo dato potrebbe essere spiegato con un effetto dominante-negativo della proteina tronca sul canale *wild type*, che risulta in un effetto proporzionalmente maggiore sugli interneuroni di topi eterozigoti piuttosto che su quelli di topi omozigoti. Inoltre, nel 2001 Raghiv et al. hanno descritto come due mutanti tronchi del canale del calcio Ca<sub>v</sub>2.2, associati all'insorgenza di atassia episodica di tipo 2, abbiano un effetto dominante-negativo sul canale *wild type*. Successivamente sono stati individuati mutanti tronchi di Nav1.2 e Nav1.5 con effetto dominante-negativo sulle rispettive isoforme *wild type* (Kamiya et al., 2004; Keller et al., 2005).

Per verificare la possibilità che l'insorgenza di una patologia grave come la SMEI possa essere legata, oltre che a livelli di proteina funzionale troppi bassi, ad un eventuale effetto dominante-negativo esercitato da mutanti tronchi sul canale *wild type*, abbiamo provato a coesprimere questi mutanti, separatamente, con Nav1.1 wt (*wild type*).

Lo studio funzionale è stato condotto esprimendo in maniera transiente il clone umano di Nav1.1 wt in presenza o meno dei mutanti in cellule tsA201. Abbiamo utilizzato la variante di *splicing* più breve (1998 aminoacidi) dell'isoforma di Nav1.1 (Noda et al., 1986; Schaller et al., 1992), che dovrebbe essere la forma maggiormente espressa nel cervello (Schaller et al., 1992). Le cellule transfettate sono state sottoposte ad esperimenti di *patch clamp* in configurazione *whole cell*.

Le correnti di sodio osservate in cellule transfettate con il canale wt da solo o in presenza dei mutanti sono paragonabili (Fig.2A e 2B); l'analisi delle tracce di corrente indica che i mutanti tronchi hNav1.1R222X e hNav1.1 R1234X non interferiscono con l'espressione di hNav1.1 wt.



**Fig.2:** Proprietà biofisiche di hNa<sub>v</sub>1.1 *wild type* da solo (blu), in presenza di hNa<sub>v</sub>1.1 R222X (arancione) e hNa<sub>v</sub>1.1 R1234X (azzurro). **A**) Tracce rappresentative della corrente di sodio registrata in seguito alla somministrazione di uno step depolarizzante a 0 mV; **B**) Valore medio della densità di corrente massima. **C**) Curve I-V **D**) Curva di voltaggio-dipendenza dell'attivazione: per hNa<sub>v</sub>1.1  $V_{1/2h} = -20.49 \pm 0.53$  mV,  $K_a = 6.36 \pm 0.21$  ( $n=26$ ); per hNa<sub>v</sub>1.1 + hNa<sub>v</sub>1.1 R222X  $V_{1/2h} = -18.86 \pm 0.68$  mV,  $K_a = 6.86 \pm 0.19$  ( $n=11$ ); per hNa<sub>v</sub>1.1 + hNa<sub>v</sub>1.1 R1234X  $V_{1/2h} = -19.18 \pm 0.58$  mV,  $K_a = 6.56 \pm 0.13$  ( $n=16$ ); **E**) Curva di voltaggio-dipendenza dell'inattivazione: per hNa<sub>v</sub>1.1  $V_{1/2h} = -55.71 \pm 1.01$  mV,  $K_a = 6.69 \pm 0.29$  ( $n=13$ ); per hNa<sub>v</sub>1.1 + hNa<sub>v</sub>1.1 R222X  $V_{1/2h} = -57.82 \pm 1.15$  mV,  $K_a = 7.08 \pm 0.56$  ( $n=11$ ); per hNa<sub>v</sub>1.1 + hNa<sub>v</sub>1.1 R1234X  $V_{1/2h} = -54.78 \pm 0.68$  mV,  $K_a = 6.97 \pm 0.48$  ( $n=10$ ). I dati sperimentali delle curve di voltaggio dipendenza sono stati sottoposti a *fitting* utilizzando l'equazione di Boltzmann. **F**) Curva della cinetica dei recuperi da un pre-pulso inattivante a 0 mV, della durata di 100 msec: per hNa<sub>v</sub>1.1  $\tau_{REC} = 2.83 \pm 0.3$  ms ( $n=12$ ); per hNa<sub>v</sub>1.1 + hNa<sub>v</sub>1.1 R222X  $\tau_{REC} = 4.52 \pm 0.4$  ms ( $n=8$ ); per hNa<sub>v</sub>1.1 + hNa<sub>v</sub>1.1 R1234X  $\tau_{REC} = 3.98 \pm 0.06$  ms ( $n=11$ ). I risultati sono espressi come media  $\pm$  SE.

Il grafico a barre (Fig. 2B), infatti, non evidenzia alcuna differenza nelle densità di corrente (la corrente registrata in ogni cellula espressa in funzione della sua capacità di membrana) massima manifestata da cellule transfettate con hNa<sub>v</sub>1.1 da solo ( $70.97 \pm 11.063$  pA/pF, n=20), con hNa<sub>v</sub>1.1 R222X ( $76 \pm 8.85$  pA/pF, n=12) e con hNa<sub>v</sub>1.1 R1234X ( $75.17 \pm 24.71$ , n=19).

Ci siamo chiesti se questi mutanti tronchi potessero interagire con il canale *wild type* e influenzarne il *gating*. Abbiamo, quindi, analizzato le proprietà biofisiche del canale *wild type* espresso in presenza o meno dei mutanti.

Le registrazioni elettrofisiologiche delle correnti di sodio sono state effettuate applicando i protocolli per lo studio dei processi di attivazione, inattivazione e recupero dall'inattivazione veloce. Nella figura 2 sono descritte le proprietà biofisiche manifestate dal canale hNa<sub>v</sub>1.1 *wild type* espresso da solo (quadrato blu), in presenza di hNa<sub>v</sub>1.1 R222X (cerchio arancione) e in presenza di hNa<sub>v</sub>1.1 R1234X (triangolo azzurro).

Per lo studio dell'attivazione, partendo da un potenziale di *holding* di  $-100$  mV, sono stati somministrati degli impulsi depolarizzanti successivi, con gradini di  $5$  mV, fino ad arrivare ad un potenziale di  $+30$  mV. Ad ogni impulso depolarizzante è associata la registrazione delle correnti di sodio che si generano attraverso la membrana plasmatica. L'intensità delle correnti viene poi convertita in conduttanza, applicando la legge generalizzata di Ohm, e normalizzata per il suo valore massimo. Il grafico che esprime la conduttanza in funzione del voltaggio somministrato costituisce la curva di voltaggio-dipendenza dell'attivazione.

Le curve di voltaggio-dipendenza dell'attivazione di cellule transfettate con la hNa<sub>v</sub>1.1 *wild type* da solo e in presenza dei mutanti sono sovrapposte (Fig.2D), indicando che la presenza di queste proteine tronche non influenza la voltaggio-dipendenza dell'attivazione del canale *wt*.

Per studiare l'inattivazione abbiamo fornito alle cellule dei pre-pulsi depolarizzanti della durata di  $100$  msec partendo da un potenziale di *holding* di  $-100$  mV fino ad arrivare ad un potenziale di  $+30$  mV. Ogni pre-pulso, che ha lo scopo di far aprire ma anche inattivare i canali, è seguito dalla misurazione del flusso di corrente che si manifesta al potenziale di  $0$  mV, cioè al potenziale di test. Tanto maggiore sarà l'entità del pre-pulso depolarizzante, tanto maggiore sarà la percentuale di canali inattivati e quindi tanto minore sarà la corrente misurata al potenziale di test. Le intensità di corrente, normalizzate al valore massimo, sono espresse in funzione del potenziale del pre-pulso e costituiscono la curva di voltaggio dipendenza dell'inattivazione.

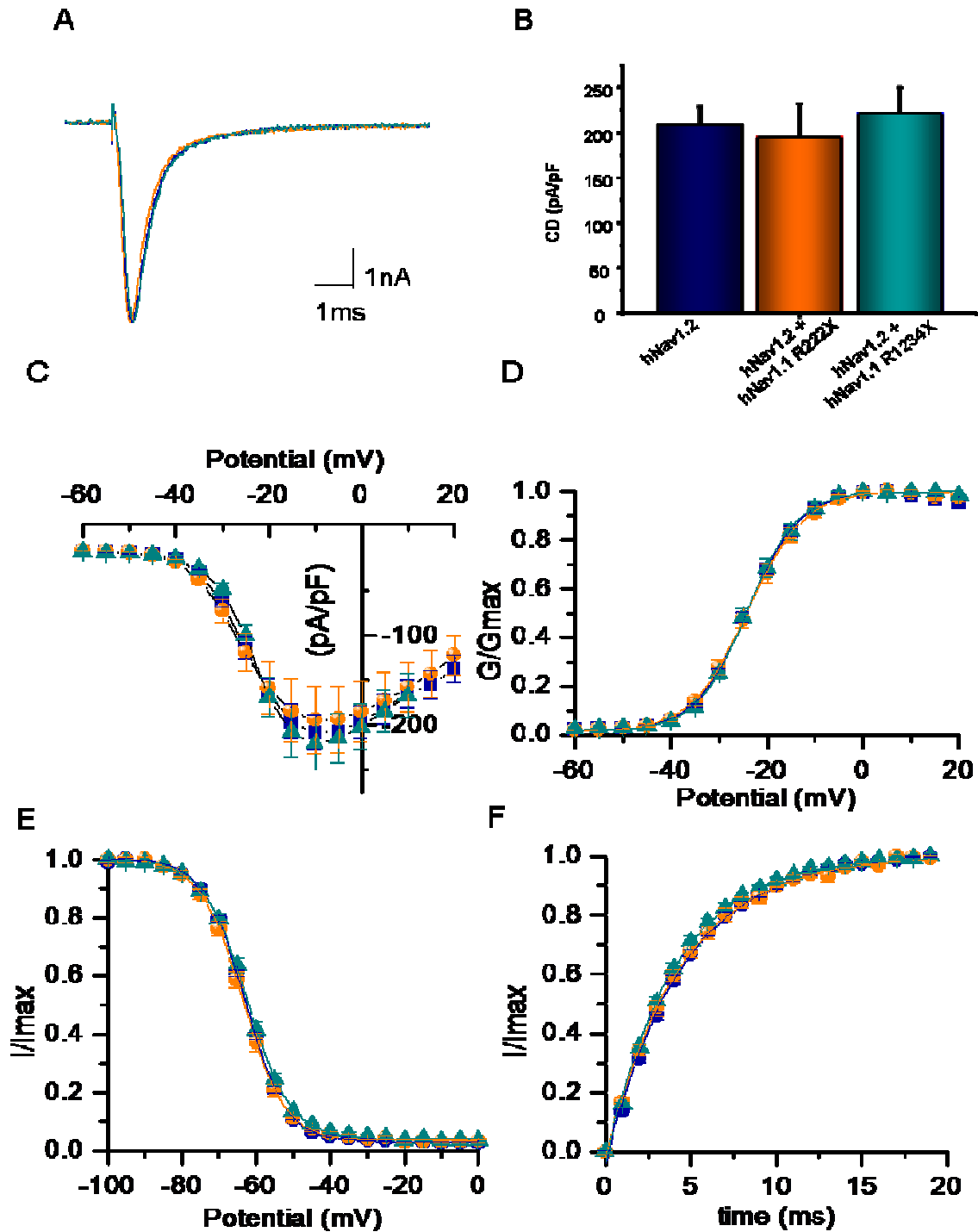
La curva di voltaggio-dipendenza dell'inattivazione di cellule transfettate con la hNa<sub>v</sub>1.1 *wild type* da solo e in presenza dei mutanti sono sovrapposte (Fig. 2E). La presenza dei

mutanti di hNa<sub>v</sub>1.1 R222X e hNa<sub>v</sub>1.1 R1234X, quindi, non influenza la voltaggio-dipendenza dall'inattivazione del canale *wt*.

Lo studio della cinetica di recupero dall'inattivazione è stato realizzato applicando uno stimolo depolarizzante a 0 mV della durata di 100 msec, che induce l'inattivazione veloce del canale, seguito da un ritorno di durata variabile al potenziale di *holding* e quindi dalla registrazione delle correnti di sodio che si manifestano al potenziale di test (0 mV). Maggiore sarà il tempo trascorso al potenziale di *holding*, maggiore sarà la percentuale di canali che è riuscita a uscire dal processo di inattivazione e quindi tanto maggiore sarà la corrente registrata al potenziale di test. Le intensità di corrente misurate al potenziale di test, normalizzate al valore massimo, espresse in funzione del tempo trascorso al potenziale di *holding* descrivono la curva di recupero dall'inattivazione.

La curva della cinetica di recupero dall'inattivazione di cellule trasfettate con la hNa<sub>v</sub>1.1 *wild type* soltanto e con i mutanti hNa<sub>v</sub>1.1 R222X o hNa<sub>v</sub>1.1 R1234X non risultano essere sovrapposte (Fig.2F). I valori assunti dalla  $\tau$  (costante di decadimento esponenziale) sono, infatti, statisticamente diversi: per hNa<sub>v</sub>1.1  $\tau_{\text{REC}}=2.83\pm0.3$  ms, per hNa<sub>v</sub>1.1+ Na<sub>v</sub>1.1 R222X  $\tau_{\text{REC}}=4.52\pm0.4$  ms con  $p= 0.003$ , mentre per hNa<sub>v</sub>1.1+Na<sub>v</sub>1.1 R1234X  $\tau_{\text{REC}}=3.98\pm0.06$  ms con  $p=0.004$ . Questo dato indica che l'isoforma hNa<sub>v</sub>1.1 *wild type* in presenza dei mutanti, in seguito al fenomeno di inattivazione veloce, impiega un arco di tempo maggiore per ritornare allo stato chiuso, pronto ad una nuova apertura. Questa modificazione nella cinetica di recupero dall'inattivazione veloce esercitata dai mutanti tronchi è consistente con una condizione di ipoeccitabilità.

Ci siamo chiesti se, data l'elevata omologia di sequenza tra le diverse isoforme del canale voltaggio dipendenti del sodio, un eventuale effetto di questi mutanti su Na<sub>v</sub>1.2 e Na<sub>v</sub>1.6, le isoforme maggiormente espresse nel sistema nervoso centrale, potesse contribuire alla gravità dei fenotipi riscontrata nei pazienti SMEI.



**Fig.3:** Proprietà biofisiche di hNav1.2 da solo (blu), in presenza di hNav1.1 R222X (arancione) e hNav1.1 R1234X (azzurro). **A)** Tracce rappresentative della corrente di sodio registrata in seguito alla somministrazione di uno step depolarizzante a 0 mV; **B)** Valore medio della densità di corrente massima. **C)** Curve I-V **D)** Curva di voltaggio-dipendenza dell'inattivazione: per hNav1.1  $V_{1/2h} = -55.71 \pm 1.01$  mV,  $K_a = 6.69 \pm 0.29$  ( $n=13$ ); per hNav1.1 + hNav1.1 R222X  $V_{1/2h} = -57.82 \pm 1.15$  mV,  $K_a = 7.08 \pm 0.56$  ( $n=11$ ); per hNav1.1 + hNav1.1 R1234X  $V_{1/2h} = -54.78 \pm 0.68$  mV,  $K_a = 6.97 \pm 0.48$  ( $n=10$ ). I dati sperimentali delle curve di voltaggio dipendenza sono stati sottoposti a *fitting* utilizzando l'equazione di Boltzmann. **E)** Curva di voltaggio-dipendenza dell'attivazione: per hNav1.1  $V_{1/2h} = -23.61 \pm 0.46$  mV,  $K_a = 5.33 \pm 0.18$  ( $n=38$ ); per hNav1.1 + hNav1.1 R222X  $V_{1/2h} = -18.86 \pm 0.68$  mV,  $K_a = 6.86 \pm 0.19$  ( $n=11$ ); per hNav1.1 + hNav1.1 R1234X  $V_{1/2h} = -19.18 \pm 0.58$  mV,  $K_a = 6.56 \pm 0.13$  ( $n=16$ ). **F)** Curva della cinetica dei recuperi da un pre-pulso inattivante a 0 mV, della durata di 100 msec: per hNav1.1  $\tau_{REC} = 2.83 \pm 0.3$  ms ( $n=12$ ); per hNav1.1 + hNav1.1 R222X  $\tau_{REC} = 4.52 \pm 0.4$  ms ( $n=8$ ); per hNav1.1 + hNav1.1 R1234X  $\tau_{REC} = 3.98 \pm 0.06$  ms ( $n=11$ ). I risultati sono espressi come media  $\pm$  SE.

Abbiamo quindi effettuato registrazioni di corrente di sodio in cellule transfettate con hNa<sub>v</sub>1.2 da solo o in presenza dei mutanti hNa<sub>v</sub>1.1 R222X e hNa<sub>v</sub>1.1 R1234X.

Come osservato nella co-espressione di questi mutanti con l'isoforma hNa<sub>v</sub>1.1, l'analisi delle tracce di corrente indica che i mutanti tronchi hNa<sub>v</sub>1.1R222X e hNa<sub>v</sub>1.1 R1234X non interferiscono con l'espressione di hNa<sub>v</sub>1.2 (Fig. 3A e 3B).

Il grafico a barre (Fig. 3), infatti, non evidenzia alcuna differenza nelle densità di corrente massima manifestata da cellule transfettate con hNa<sub>v</sub>1.2 da solo ( $208.58 \pm 19.46$  pA/pF, n=40), con hNa<sub>v</sub>1.1 R222X ( $194.48 \pm 37.34$  pA/pF, n=15) e con hNa<sub>v</sub>1.1 R1234X ( $220.81 \pm 28.97$ , n=17).

Anche in questo caso, ci siamo chiesti se questi mutanti tronchi potessero interagire con hNa<sub>v</sub>1.2 e influenzarne il *gating*. Abbiamo, quindi, analizzato le proprietà biofisiche di questa isoforma espressa in presenza o meno dei mutanti.

Le registrazioni elettrofisiologiche delle correnti di sodio sono state effettuate applicando i protocolli per lo studio dei processi di attivazione, inattivazione e recupero dall'inattivazione veloce precedentemente utilizzati. Nella figura 3 sono descritte le proprietà biofisiche manifestate dal canale hNa<sub>v</sub>1.2 espresso da solo (quadrato blu), in presenza di hNa<sub>v</sub>1.1 R222X (cerchio arancione) e in presenza di hNa<sub>v</sub>1.1 R1234X (triangolo azzurro).

Le curve di voltaggio-dipendenza di attivazione e inattivazione e le curve relative alla cinetica di recupero dall'inattivazione veloce di cellule transfettate con la hNa<sub>v</sub>1.2 da solo e in presenza dei mutanti sono sovrapposte (Fig. 3D, 3E e 3F), indicando che la presenza dei mutanti di hNa<sub>v</sub>1.1 R222X e hNa<sub>v</sub>1.1 R1234X non influenza le proprietà di *gating* di questa isoforma.

Siamo quindi passati ad analizzare gli eventuali effetti della presenza dei due mutanti sull'isoforma hNav1.6.

Per questo scopo abbiamo utilizzato una linea cellulare che esprime in maniera costitutiva hNa<sub>v</sub>1.6. Questa linea è stata transfettata in modo transiente con hNa<sub>v</sub>1.1 R222X o hNa<sub>v</sub>1.1 R1234X o con un plasmide vuoto (lo stesso plasmide in cui sono inseriti i mutanti, pIRES YFP), per assicurarci che gli effetti osservati non fossero dipendenti dalla transfezione.

L'analisi delle tracce di corrente ottenute esprimendo questi mutanti con l'isoforma hNa<sub>v</sub>1.6 indica che i mutanti tronchi hNa<sub>v</sub>1.1R222X e hNa<sub>v</sub>1.1 R1234X interferiscono con l'espressione di hNa<sub>v</sub>1.6 (Fig. 4A e 4B). Il grafico a barre (Fig. 4), infatti, mostra differenze statisticamente significative nelle densità di corrente massima manifestata da cellule transfettate con il plasmide vuoto ( $197.83 \pm 13.24$  pA/pF, n=14), con hNa<sub>v</sub>1.1 R222X ( $139.75 \pm 12.7$  pA/pF, n=10, p=0.005) e con hNa<sub>v</sub>1.1 R1234X ( $148.15 \pm 18.62$ , n=11, p=0.03). Questo risultato, tuttavia, potrebbe essere un artefatto; infatti, l'espressione transiente risulta

in un'overespressione dei canali tronchi che potrebbe andare a sovraccaricare il sistema di sintesi ed espressione delle altre proteine di membrana, determinando così un'aspecifica diminuzione di hNav1.6. Stiamo effettuando esperimenti di controllo per verificare questo aspetto.

Anche in questo caso abbiamo verificato se questi mutanti tronchi potessero interagire con hNav1.6 e influenzarne il *gating*. Le registrazioni elettrofisiologiche delle correnti di sodio sono state effettuate applicando i protocolli per lo studio dei processi di attivazione, inattivazione e recupero dall'inattivazione veloce precedentemente utilizzati.

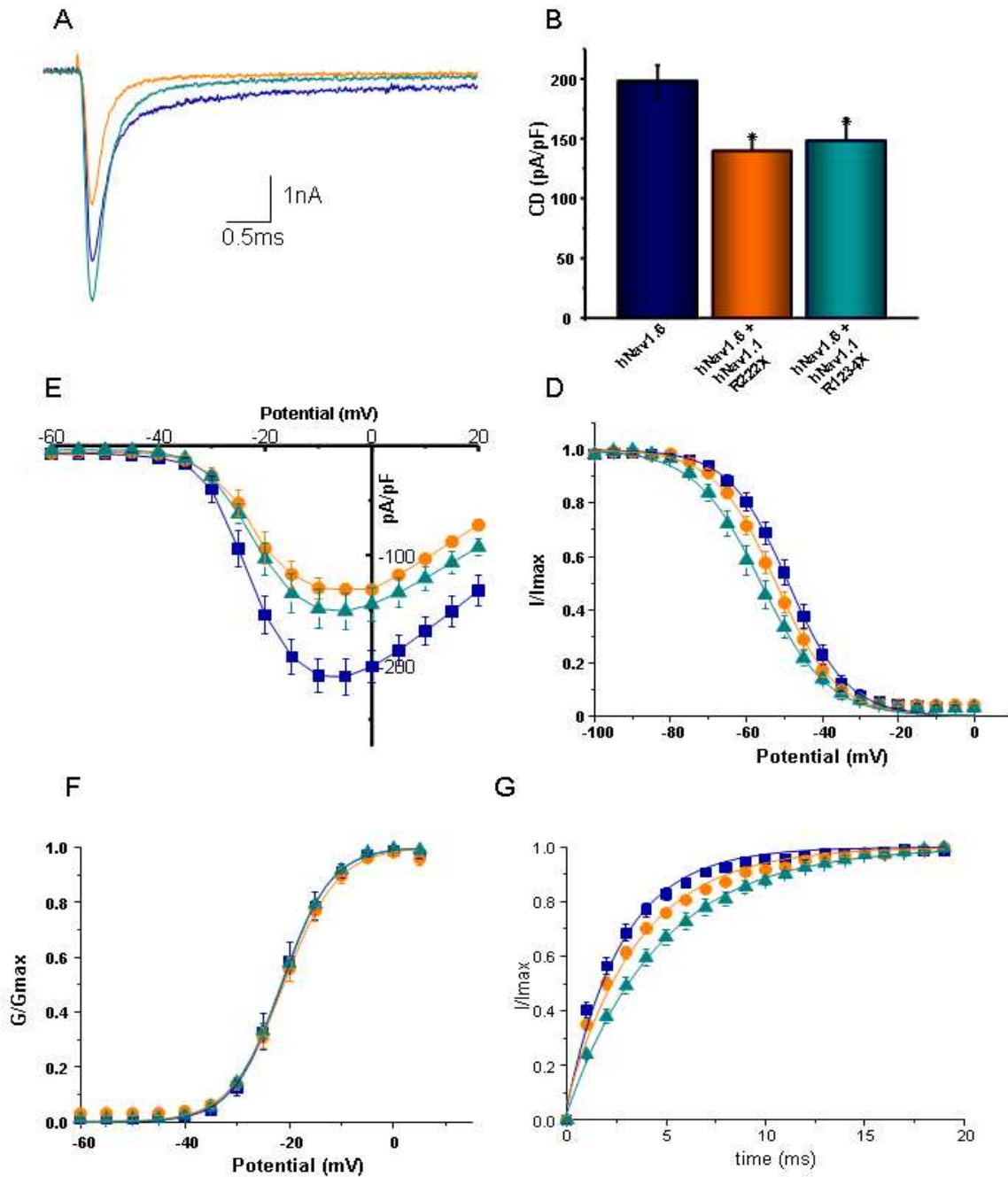
Nella figura 4 sono descritte le proprietà biofisiche manifestate dal canale hNav1.6 co-transfettato con il plasmide vuoto (quadrato blu), in presenza di hNav1.1 R222X (cerchio arancione) e in presenza di hNav1.1 R1234X (triangolo azzurro).

Le curve di voltaggio-dipendenza dell'attivazione di cellule transfettate con il plasmide vuoto o con mutanti sono sovrapposte (Fig.4D), indicando che la presenza di queste proteine tronche non influenza la voltaggio-dipendenza dell'attivazione di hNav1.6.

La curva di voltaggio-dipendenza dell'inattivazione di cellule transfettate con il plasmide vuoto e con hNav1.1 R222X non sono statisticamente differenti (Fig. 4E), indicando che questo mutante non influenza la voltaggio-dipendenza dall'inattivazione di hNav1.6. La curva relativa a cellule transfettate con hNav1.1 R1234X mostra, invece, uno *shift* significativo ( $p=0.006$ ) verso potenziali più negativi, indicando che questo mutante favorisce il processo di inattivazione di hNav1.6; questo effetto è consistente con una condizione di ipoeccitabilità.

Abbiamo osservato delle differenze anche nelle cinetiche di recupero dall'inattivazione veloce (Fig.4F). In presenza di entrambi i mutanti, infatti, l'isoforma hNav1.6 mostra maggiori tempi di recupero dall'inattivazione veloce, come dimostrano i valori assunti dalla  $\tau$ , statisticamente diversi (per hNav1.1 R222X  $p=0.01$ , hNav1.1 R1234X  $p=0.001$ ). Questo dato indica che, analogamente a hNav1.1, hNav1.6 in presenza dei mutanti in seguito al fenomeno di inattivazione veloce impiega un arco di tempo maggiore per ritornare allo stato chiuso, pronto ad una nuova apertura.





**Fig.4:** Proprietà biofisiche di hNav1.6 in presenza del plasmide vuoto (blu), in presenza di hNav1.1 R222X (arancione) e hNav1.1 R1234X (azzurro). **A)** Tracce rappresentative della corrente di sodio registrata in seguito alla somministrazione di uno step depolarizzante a 0 mV; **B)** Valore medio della densità di corrente massima. \*p<0.05 **C)** Curve I-V **D)** Curva di voltaggio-dipendenza dell'attivazione: per hNav1.6+plasmide vuoto  $V_{1/2h}=-21.24\pm3.31\text{mV}$ ,  $K_a=4.22\pm0.75$  ( $n=7$ ); per hNav1.6+ hNav1.1 R222X  $V_{1/2h}=-21.02\pm2.54\text{mV}$ ,  $K_a=5.02\pm0.69$  ( $n=7$ ); per hNav1.6+hNav1.1 R1234X  $V_{1/2h}=-21.35\pm0.95\text{mV}$ ,  $K_a=4.8\pm0.46$  ( $n=7$ ). **E)** Curva di voltaggio-dipendenza dell'inattivazione: per hNav1.6+ plasmide vuoto  $V_{1/2h}=-49\pm4.18\text{mV}$ ,  $K_a=7.61\pm0.8$  ( $n=7$ ); per hNav1.6+ hNav1.1 R222X  $V_{1/2h}=-52.28\pm3.35\text{mV}$ ,  $K_a=7.8\pm0.85$  ( $n=7$ ); per hNav1.6+ hNav1.1 R1234X  $V_{1/2h}=-56.32\pm4.09\text{mV}$ ,  $K_a=8.27\pm1.56$  p=0.006 ( $n=7$ ). I dati sperimentali delle curve di voltaggio dipendenza sono stati sottoposti a *fitting* utilizzando l'equazione di Boltzmann. **F)** Curva della cinetica dei recuperi da un pre-pulso inattivante a 0 mV, della durata di 100 msec: per hNav1.6+ plasmide vuoto  $\tau_{\text{REC}}=3.28\pm0.67\text{ms}$  ( $n=7$ ); per hNav1.6+ hNav1.1 R222X  $\tau_{\text{REC}}=4.16\pm0.47\text{ms}$  p=0.01 ( $n=7$ ); per hNav1.6+ hNav1.1 R1234X  $\tau_{\text{REC}}=4.86\pm0.79\text{ms}$  p=0.002 ( $n=7$ ). I risultati sono espressi come media  $\pm$  SE.

I dati ottenuti suggeriscono che, sebbene questi mutanti tronchi dell'isoforma hNa<sub>v</sub>1.1 non abbiano alcun effetto dominante-negativo sulle isoforme dei canali voltaggio dipendenti del sodio maggiormente espresse nel sistema nervoso centrale, possono comunque contribuire alla condizione di ipoeccitabilità che deriva dagli scarsi livelli di proteina funzionante. Infatti i mutanti hNa<sub>v</sub>1.1 R222X e hNa<sub>v</sub>1.1 1234X sono in grado di modificare le proprietà di *gating* di hNa<sub>v</sub>1.1 e hNa<sub>v</sub>1.6, contribuendo alla condizione di ipoeccitabilità e aumentando, in ultima analisi, la gravità del fenotipo.

DISCUSSIONE  
progetto “MUTANTI TRONCHI”

La SMEI (*severe myoclonic epilepsy of infancy*), conosciuta anche come sindrome di Dravet, è un'encefalopatia epilettiforme farmaco-resistente, che insorge intorno al primo anno di vita e si manifesta con crisi generalizzate toniche, cloniche e tonico-cloniche inizialmente indotte da febbre. Successivamente i pazienti sono soggetti anche ad altri tipi di crisi quali mioclonie, crisi di assenza e crisi parziali. Entro due anni dall'insorgenza della malattia, gli affetti vanno incontro a declino mentale e a rallentamento nello sviluppo psicomotorio.

L'80% degli individui affetti da SMEI presenta mutazioni del gene SCN1A, che codifica per l'isoforma Na<sub>v</sub>1.1 del canale voltaggio dipendente del sodio. In questo studio abbiamo focalizzato la nostra attenzione su due mutazioni *de novo*, R222X e R1234X (Claes et al., 2001; Nabbout et al., 2003; Fukuma et al., 2004; Oguni et al., 2005; Mancardi et al., 2006; Harkin et al., 2007; Depienne et al., 2009; Löfgren et al., 2010) che, come la maggior parte delle mutazioni Na<sub>v</sub>1.1 associate all'insorgenza di questa patologia, introducono un codone di stop prematuro causando la produzione di proteina tronca non funzionale. L'ipotesi più accreditata è che il meccanismo alla base dello sviluppo della SMEI sia riconducibile alla conseguente condizione di aploinsufficienza, cioè alla presenza di bassi livelli di proteina funzionale.

Nel 2006 Yu et al. hanno caratterizzato un modello murino di SMEI; in questi topi buona parte dell'ultimo esone di SCN1A è stata sostituita con il gene per la resistenza alla neomicina. Questa sostituzione comporta la produzione di canale non funzionale, mimando quindi quanto avviene nei pazienti affetti da SMEI. Da questi studi è emerso che la deplezione di SCN1A riduce drasticamente le correnti generate da neuroni GABAergici inibitori ma non quelle generate da neuroni piramidali eccitatori, fornendo una spiegazione al fatto che mutazioni *loss of function* di SCN1A possano portare ad una condizione di elevata ipereccitabilità neuronale. Dalla registrazione delle correnti generate dagli interneuroni è emerso, inoltre, che la diminuzione di corrente negli interneuroni di topi etero- ed omo-zigoti non è lineare come ci si aspettava; questo dato potrebbe essere spiegato con un effetto dominante-negativo della proteina tronca sul canale *wild type*, che risulta in un effetto proporzionalmente maggiore sui topi eterozigoti piuttosto che sugli omozigoti. Inoltre, nel 2001 Raghbi et al. hanno descritto come due mutanti tronchi del canale del calcio Ca<sub>v</sub>2.2, associati all'insorgenza di atassia episodica di tipo 2, abbiano un effetto dominante-negativo sul canale *wild type*. Successivamente sono stati individuati mutanti tronchi di Na<sub>v</sub>1.2 e Na<sub>v</sub>1.5 con effetto dominante-negativo sulle rispettive isoforme *wild type* (Kamiya et al., 2004; Keller et al., 2005).

Ci siamo proposti, quindi, di verificare la possibilità che l'insorgenza di una patologia grave come la SMEI possa essere legata, oltre che a livelli di proteina funzionale troppo bassi, all'effetto dominante-negativo esercitato da mutanti tronchi di  $\text{Na}_v1.1$  su  $\text{Na}_v1.1$  stesso. Abbiamo pensato, inoltre, di testare il loro effetto anche sulle isoforme  $\text{Na}_v1.2$  e  $\text{Na}_v1.6$  che, come  $\text{Na}_v1.1$ , sono espresse ad alti livelli nel sistema nervoso centrale e, in alcuni casi, negli stessi tipi cellulari. In particolare,  $\text{Na}_v1.1$  è espresso ad alti livelli nel cervelletto (cellule del Purkinje), a livelli più bassi nello striato, nell'ippocampo, nel talamo e nella corteccia (Black et al., 1994; Brysch et al., 1991). Il *pattern* di espressione cellulare di  $\text{Na}_v1.2$  è molto simile a quello osservato per  $\text{Na}_v1.1$  (Brysch et al., 1991), mentre  $\text{Na}_v1.6$  è espresso principalmente nelle cellule granulari del cervelletto e nelle cellule granulari e piramidali dell'ippocampo e nella corteccia (Schaller et al., 2000) ed è presente anche nelle cellule del Purkinje (Krzemien et al., 2000; Whitaker et al., 2001). Vista, quindi, l'elevata omologia di sequenza di queste isoforme e la coespressione, in alcuni casi, negli stessi tipi cellulari è possibile ipotizzare un eventuale effetto dominante-negativo dei mutanti tronchi di  $\text{Na}_v1.1$  anche su  $\text{Na}_v1.2$  e  $\text{Na}_v1.6$ . E' possibile, inoltre, che questi mutanti tronchi, siano in grado di influenzare le proprietà di *gating* del canale. Kamiya et al. nel 2004 hanno infatti riportato il caso di un mutante tronco di  $\text{Nav}1.2$  (R102X) causante SMEI che causa uno *shift* della voltaggio-dipendenza dell'inattivazione del canale *wt*. Anche in questo caso abbiamo preso in considerazione gli eventuali effetti esercitati sulle isoforme  $\text{Na}_v1.2$  e  $\text{Na}_v1.6$ . L'espressione a livello subcellulare di queste isoforme è ancora oggetto di discussione, in particolare a causa di dati contrastanti presenti in letteratura. Tuttavia, è noto che la loro espressione sia sovrapposta soltanto parzialmente.  $\text{Na}_v1.1$  viene infatti espressa principalmente a livello somato-dendritico, mentre  $\text{Na}_v1.2$  e  $\text{Na}_v1.6$  sono presenti nell'AIS (*axon initial segment*) e nei nodi di Ranvier. Tuttavia Ogiwara et al. Nel 2007 hanno pubblicato un lavoro dove sostengono la localizzazione specifica di  $\text{Na}_v1.1$  a livello dell'AIS in interneuroni parvalbumina positivi. Nel 2008, poi, Lorincz e Nusser hanno confermato questi dati, specificando che, mentre  $\text{Na}_v1.6$  è distribuito in tutto l'AIS, l'espressione di  $\text{Na}_v1.1$  è limitata alla sua parte iniziale nei neuroni corticali e cerebellari. Inoltre, una simile distribuzione di queste subunità è stata osservata nelle cellule gangliari della retina (Van Wart et al., 2007). Al contrario, nei neuroni del bulbo olfattorio queste due isoforme sono espresse in maniera uniforme lungo tutto l'AIS (Lorincz e Nusser, 2007).

Abbiamo ingegnerizzato le mutazioni selezionate nell'isoforma umana di  $\text{Na}_v1.1$ . La mutazione R222X porta alla produzione di una proteina che presenta soltanto i primi tre segmenti e parte del segmento 4 del dominio I; la mutazione R1234X, invece, tronca il canale al livello del primo segmento del dominio III.

Per lo studio e la caratterizzazione dei due mutanti tronchi abbiamo scelto come sistema di espressione eterologa cellule tsA201 (un subclone delle cellule HEK, *human embryonic kidney*) e cellule HEK esprimenti in maniera costitutiva Nav1.6. Le cellule tsA201 sono state utilizzate per coesprimere i mutanti con le isoforme Nav1.1 e Nav1.2 del canale voltaggio-dipendente del sodio; le cellule HEK sono state invece utilizzate per studiare l'effetto dei mutanti sull'isoforma Nav 1.6 del canale voltaggio dipendente del sodio. L'analisi funzionale è stata condotta attraverso esperimenti elettrofisiologici di *patch clamp* in configurazione *whole cell*. Sono state eseguite registrazioni elettrofisiologiche finalizzate a valutare la densità di corrente e le principali proprietà biofisiche, confrontando il comportamento di canale di hNav1.1, hNav1.2 e hNav1.6 in presenza o meno dei mutanti.

L'espressione in cellule tsA201 di hNav1.1 in presenza o meno dei mutanti hNav1.1 R222X o hNav1.1 R1234X ha rivelato che questi mutanti non influiscono sui livelli di espressione di questa isoforma; tuttavia è emerso che l'interazione di entrambi i mutanti tronchi con hNav1.1 *wt* causa una diminuzione della sua capacità di recupero dall'inattivazione veloce. Le  $\tau$  dei tempi di recupero assumono, infatti, valori maggiori quando hNav1.1 *wt* viene espresso in presenza dei mutanti. Queste modificazioni nella cinetica di recupero dall'inattivazione veloce esercitata dai mutanti tronchi osservate *in vitro* sono consistenti con una *loss of function*, che *in vivo* potrebbe contribuire ad aumentare la condizione di ipoeccitabilità legata all'aploinsufficienza caratteristica dei pazienti SMEI. Non è chiaro, tuttavia, come questi mutanti tronchi siano in grado di interagire con la subunità  $\alpha$  *wt*. I dati presenti in letteratura, infatti, indicano che i mutanti tronchi di SCN1A non vengono espressi in membrana (Yu et al., 2006; Ogiwara et al, 2007). Yu et al. (2006), utilizzando topi *knock out* esprimenti un gene SCN1A dove l'ultimo codone è sostituito dal gene per la resistenza alla neomicina, hanno effettuato degli esperimenti di *western blot* per valutare la presenza dei mutanti in membrana in topi *wt*, eterozigoti ed omozigoti, evidenziando una riduzione di circa il 50% negli eterozigoti, completa negli omozigoti. Ogiwara et al. (2007), utilizzando invece topi *knock in* (R1407X), hanno confermato che i mutanti tronchi non vengono espressi in membrana; nel loro lavoro hanno inoltre valutato, tramite analisi *northern blot*, i livelli di espressione del messaggero per SCN1A: negli omozigoti, seppur a bassi livelli rispetto ai topi *wt*, il messaggero per Scn1a viene espresso. L'espressione di mutanti tronchi a livelli citoplasmatico è stata dimostrata anche da Sugawara et al. nel 2003 con esperimenti di *western blot*. Nel nostro laboratorio stiamo effettuando esperimenti analoghi in cellule trasfettate con mutanti hNav1.1 R222X o hNav1.1 R1234X, per valutare la loro espressione; i dati preliminari indicano la loro effettiva presenza a livello citoplasmatico. Rimane, quindi,

da capire come questi mutanti, espressi a livello citoplasmatico, siano in grado di influenzare il *gating* del canale in membrana. Tuttavia Poelzing et al. (2006) hanno osservato, utilizzando il clone umano di  $\text{Na}_v1.5$ , l'interazione tra subunità  $\alpha$  anche a livello citoplasmatico. Inoltre, in accordo con i dati da noi ottenuti, Kamiya et al. (2004) hanno dimostrato che un mutante tronco di  $\text{Na}_v1.2$  è in grado di modificare le proprietà di *gating* di questa isoforma.

L'espressione in cellule tsA201 di  $\text{hNa}_v1.2$  in presenza o meno dei mutanti  $\text{hNa}_v1.1$  R222X o  $\text{hNa}_v1.1$  R1234X ha rivelato, anche in questo caso, che questi mutanti non influiscono sui livelli di espressione di questa isoforma; inoltre, la presenza di questi mutanti non ha alcun effetto sulle proprietà di *gating* di  $\text{hNa}_v1.2$ . Il fatto che i mutanti influenzino le proprietà biofisiche di  $\text{hNa}_v1.1$  ma non quelle di  $\text{hNa}_v1.2$  può essere legato alle differenze che ci sono tra queste due isoforme, sebbene l'omologia di sequenza sia piuttosto elevata.

L'espressione dell'isoforma  $\text{hNa}_v1.6$ , invece, sembra essere influenzata dalla presenza di entrambi i mutanti. La diminuzione di corrente osservata in presenza di questi, tuttavia, potrebbe essere un artefatto. L'espressione transiente di  $\text{hNa}_v1.1$  R222X e  $\text{hNa}_v1.1$  R1234X, infatti, fa sì che questi vengano overespressi; queste proteine, sintetizzate a livelli molto elevati rispetto alla norma, potrebbero competere per gli stessi effettori del *folding* e del *trafficking* delle altre proteine di membrana, tra cui  $\text{hNa}_v1.6$ . Quindi, la diminuzione dei livelli di  $\text{hNa}_v1.6$  potrebbe essere semplicemente un effetto aspecifico. Ritengo importante completare i nostri dati confermando questa ipotesi, verificando cioè che l'overespressione di una qualsiasi altra proteina di membrana che non interagisce con i canali voltaggio dipendenti del sodio influenzi anch'essa l'espressione in membrana di  $\text{hNa}_v1.6$ . La caratterizzazione delle proprietà funzionali ha messo in luce che, in presenza di  $\text{hNa}_v1.1$  R1234X, ma non di  $\text{hNa}_v1.1$  R222X, la curva di voltaggio-dipendenza dell'inattivazione di  $\text{hNa}_v1.6$  mostra uno *shift* verso potenziali più negativi, indicando che questo mutante favorisce il processo di inattivazione di questa isoforma, consistentemente con una condizione di ipoeccitabilità. Inoltre in presenza sia di  $\text{hNav}1.1$  R222X che di  $\text{hNav}1.1$  R1234X  $\text{hNa}_v1.6$  mostra maggiori tempi di recupero dall'inattivazione veloce, come dimostrano i valori assunti dalla  $\tau$ , statisticamente diversi. Anche questo dato indica che, analogamente a  $\text{hNa}_v1.1$ ,  $\text{hNa}_v1.6$  in presenza dei mutanti in seguito al fenomeno di inattivazione veloce impiega un arco di tempo maggiore per ritornare allo stato chiuso, pronto ad una nuova apertura. Allo stesso modo, quindi, le modificazioni osservate *in vivo* potrebbero contribuire ad aumentare la condizione di ipoeccitabilità legata all'aploinsufficienza caratteristica dei pazienti SMEI.

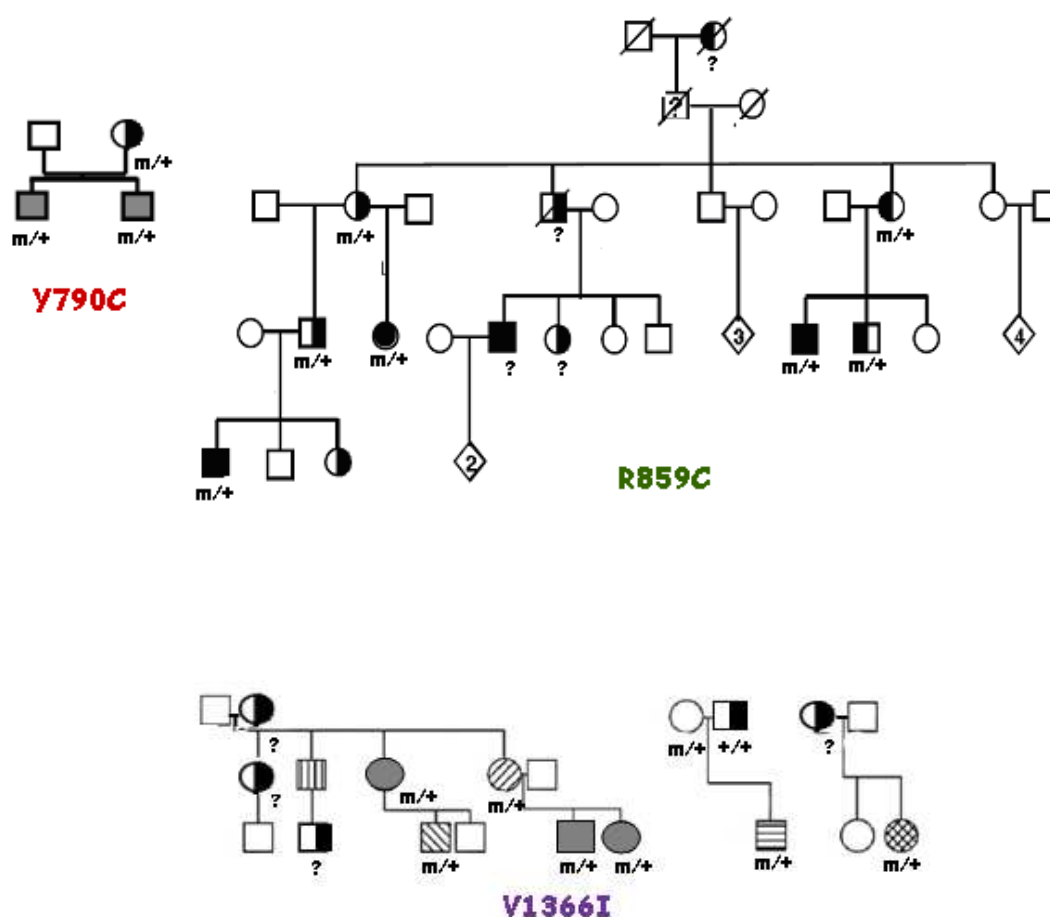
I risultati ottenuti escludono un effetto dominante-negativo dei mutanti hNa<sub>v</sub>1.1 R222X e hNa<sub>v</sub>1.1 R1234X sull'espressione delle isoforme hNa<sub>v</sub>1.1, hNa<sub>v</sub>1.2 e hNa<sub>v</sub>1.6; tuttavia, abbiamo osservato che entrambi i mutanti sono in grado di influenzare le proprietà di *gating* di hNa<sub>v</sub>1.1 e hNa<sub>v</sub>1.6, favorendo una condizione di ipoeccitabilità. Gli effetti osservati su queste isoforme si andrebbero a sommare, quindi, alla condizione di aploinsufficienza legata alla presenza di bassa proteina funzionale, contribuendo così alla gravità del fenotipo. Questi risultati potrebbero sembrare in contrasto con quelli ottenuti da Yu et al. nel 2006; gli autori, nella caratterizzazione delle correnti.

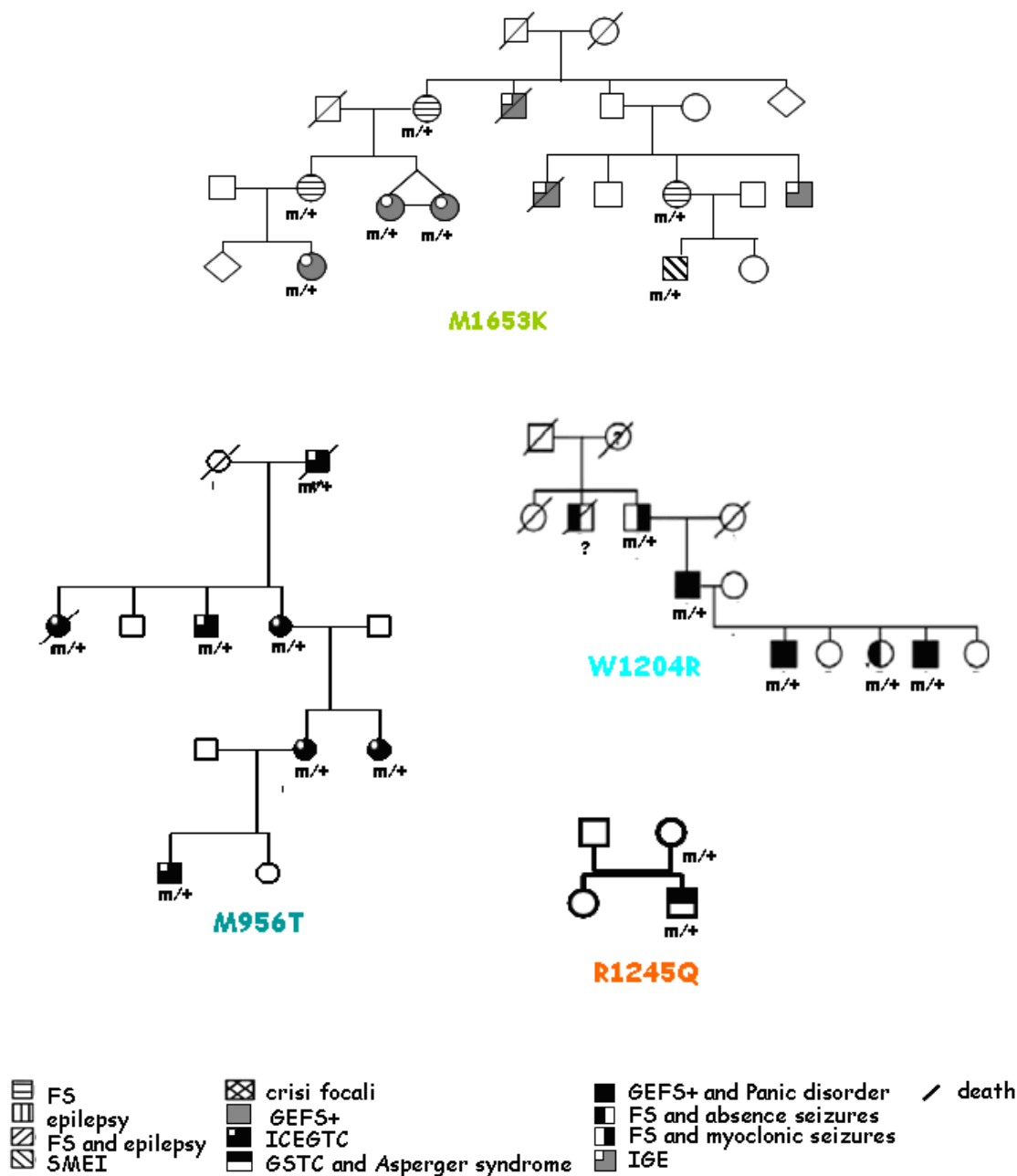


RISULTATI  
progetto “MUTANTI *FOLDING*  
*DEFECTIVE*”

La GEFS+ (*generalized epilepsy with febrile seizures plus*) è un'epilessia familiare caratterizzata da trasmissione autosomica dominante, contraddistinta da notevole variabilità fenotipica anche all'interno della stessa famiglia. In questo studio abbiamo focalizzato la nostra attenzione su mutazioni a carico di Na<sub>v</sub>1.1, il *target* di mutazioni epiletogene che causano GEFS+ più frequentemente colpito. In particolare, abbiamo scelto questo *target* perché recentemente è stato descritto un meccanismo patogenetico legato a mutazioni di questa isoforma che potrebbe spiegare l'elevata variabilità fenotipica presente all'interno delle famiglie GEFS+ (Rusconi et al., 2007; 2009).

L'analisi di *screening* genetico e la consultazione dei dati presenti in letteratura hanno consentito la selezione di diverse famiglie GEFS+ con mutazioni del gene SCN1A, codificante per l'isoforma Na<sub>v</sub>1.1 del canale voltaggio-dipendente del sodio, caratterizzate da variabilità fenotipica particolarmente elevata e dalla presenza di pazienti affetti da SMEI (Fig.1).



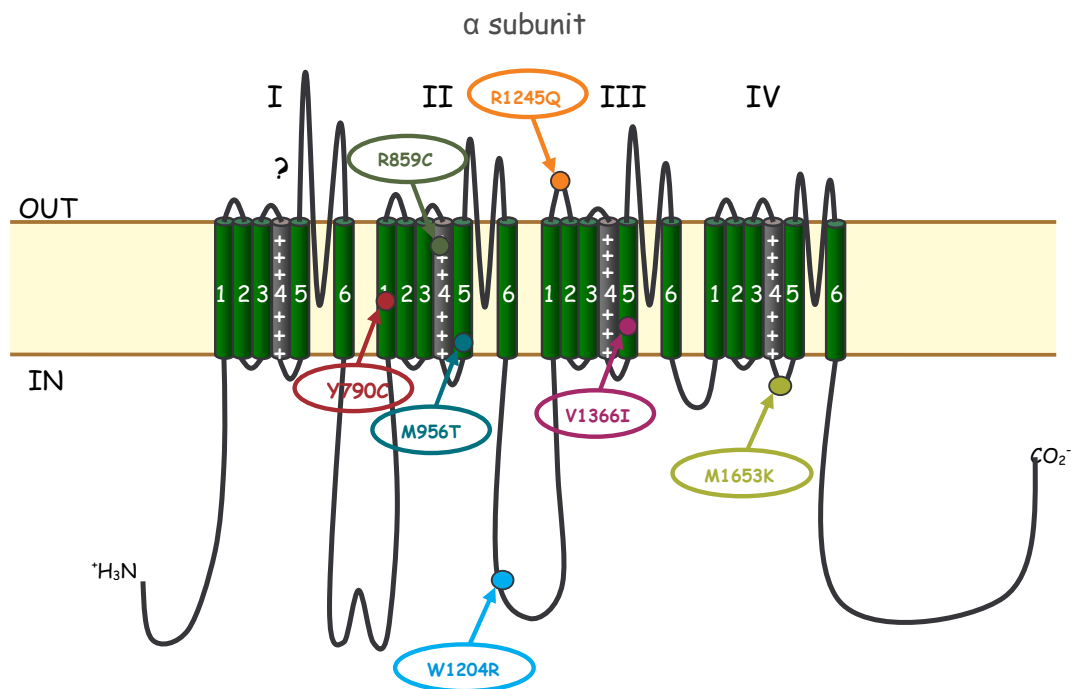


**Fig.1:** Albero genealogico delle famiglie affette selezionate per il nostro studio. FS = *febrile seizures*; SMEI= *severe myoclonic epilepsy of infancy*; GEFS+= *Genetic epilepsy with febrile seizures plus*; ICEGTS= *Intractable childhood epilepsy with generalized tonic-clonic seizures*; GSTC= *generalized tonic-clonic seizures*; IGE= *idiopathic generalized epileps*. Alla base degli alberi genealogici sono riportate, con colori diversi, le mutazioni epilettogene di Na<sub>v</sub>1.1 identificate in ogni famiglia. Le lettere indicano gli aminoacidi sostituiti, i numeri la posizione della mutazione rispetto alla sequenza aminoacidica.

Le mutazioni selezionate comportano le seguenti sostituzioni:

- sostituzione di una tirosina, situata in posizione 790 nella sequenza codificante, con una cisteina (Y790C);

- sostituzione di un'arginina, situata in posizione 859 nella sequenza codificante, con una cisteina (R859C);
- sostituzione di una metionina, situata in posizione 956 nella sequenza codificante, con una treonina (M956T);
- sostituzione di un triptofano, situata in posizione 1204 nella sequenza codificante, con un'arginina (W1204R);
- sostituzione di un'arginina, situata in posizione 1245 nella sequenza codificante, con una glutamina (R1245Q);
- sostituzione di una valina, situata in posizione 1366 nella sequenza codificante, con una isoleucina (V1366I);
- sostituzione di una metionina, situata in posizione 1653 nella sequenza codificante, con una lisina (M1653K).



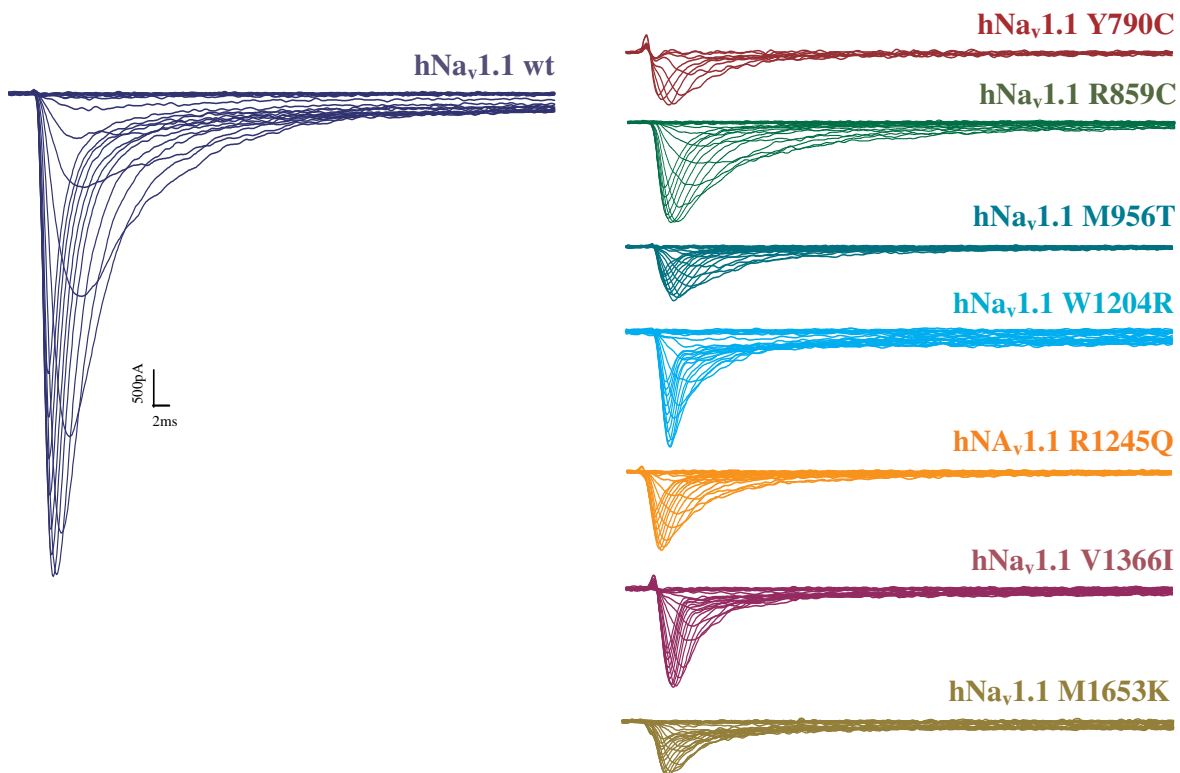
**Fig.2: Schematizzazione del canale voltaggio-dipendente del sodio.** La subunità  $\alpha$  è costituita da 4 domini (I-IV) ognuno dei quali a sua volta è strutturato in 6 segmenti trans-membrana (1-6). I cilindri colorati in verde (e in grigio nel caso dei sensori del voltaggio), rappresentano i segmenti transmembrana ad  $\alpha$ -elica. La posizione delle diverse mutazioni è segnalata da pallini colorati.

Il fatto che queste mutazioni siano localizzate in segmenti e domini diversi del canale (Fig.2) è molto importante, perchè in questo studio vogliamo anche verificare se le mutazioni che causano problemi di *folding* solo localizzate prevalentemente in particolari *hot spots* (le mutazione pubblicate fino ad oggi sono entrambe localizzate nella zona C-terminale del canale) o sono distribuite omogeneamente nel canale. Le mutazioni Y790C, R859C e M956T

sono situate nel secondo dominio, a livello dei segmenti S1, S4 e S5; la mutazione W1204R si trova nel *loop* citoplasmatico che unisce dominio II e dominio III; le mutazioni R1245Q e V1366I sono localizzate nel terzo dominio, la prima nel *loop* extracellulare che unisce S1 con S2 e la seconda in S5; infine, la mutazione M1653K è situata nel *loop* intracellulare che unisce i segmenti S4 e S5 del dominio IV.

Lo studio funzionale effettuato al fine di valutare gli effetti di queste mutazioni è stato condotto transfettando in maniera transiente il clone umano di Na<sub>v</sub>1.1 wt (*wild type*) o mutante in cellule tsA201. Abbiamo utilizzato la variante di *splicing* più breve (1998 aminoacidi) dell'isoforma di Na<sub>v</sub>1.1 (Noda et al., 1986; Schaller et al., 1992), che dovrebbe essere la forma maggiormente espressa nel cervello (Schaller et al., 1992).

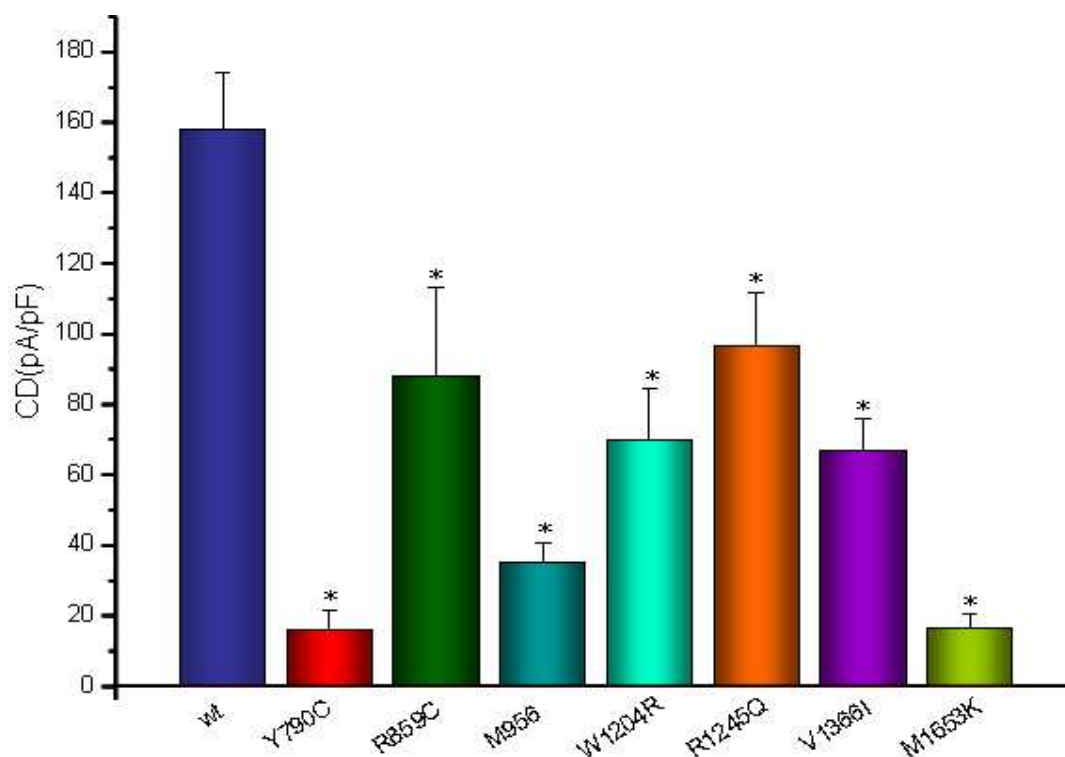
Le cellule transfettate con la subunità  $\alpha$  *wild type* o mutata sono state sottoposte ad esperimenti di *patch clamp* in configurazione *whole cell*.



**Fig.3:** Tracce rappresentative della corrente di sodio registrata tra -60 e +15 mV, con incrementi di 5 mV a partire da un potenziale di -100 mV, in cellule tsA201 transfettate con hNa<sub>v</sub>1.1 wt (in blu), hNa<sub>v</sub>1.1 Y790C (in rosso scuro), hNa<sub>v</sub>1.1 R859C (in verde), hNa<sub>v</sub>1.1 M956T (in azzurro), hNa<sub>v</sub>1.1 W1204R (in ciano), hNa<sub>v</sub>1.1 R1245Q (in arancione), hNa<sub>v</sub>1.1 V1366I (in viola) e hNa<sub>v</sub>1.1 M1653K (in verde oliva).

Nelle cellule transfettate con i diversi mutanti di hNa<sub>v</sub>1.1 la corrente di sodio risulta essere inferiore a quella registrata in cellule transfettate con il canale wt (Fig.3), e in alcuni casi (hNa<sub>v</sub>1.1 Y790C, hNa<sub>v</sub>1.1 M956T e hNa<sub>v</sub>1.1 M1653K) è paragonabile alle correnti endogene solitamente presenti nelle cellule tsA201 (dato non mostrato).

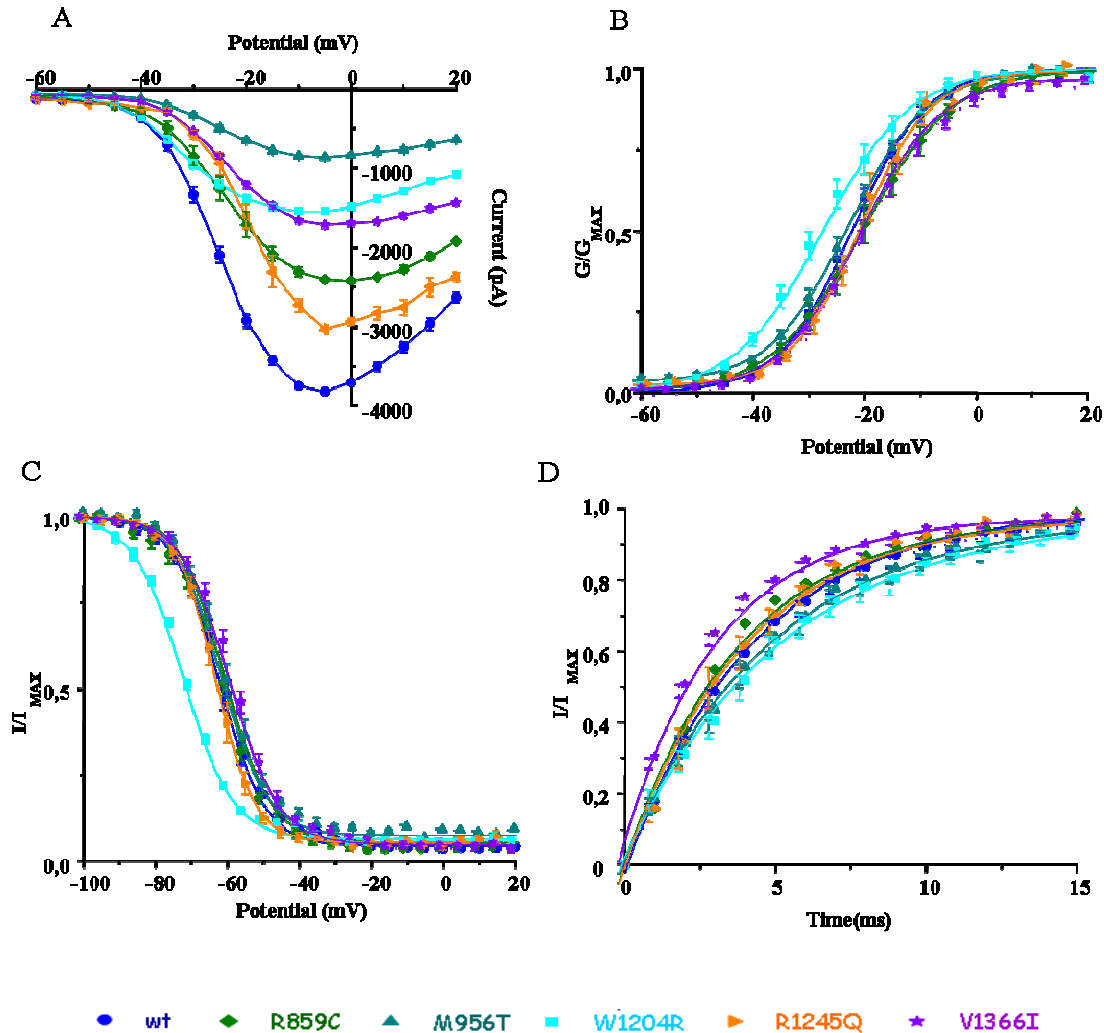
Le riduzioni di corrente osservate indicano che i mutanti in esame sono dei mutanti *loss of function*, come la maggior parte dei mutanti SMEI e dei mutanti GEFS+ (Meisler and Kearney, 2005; Rasgdale, 2008; Catterall 2010). Il grafico a barre (Fig.4) evidenzia, infatti, una riduzione significativa della densità di corrente (cioè la corrente registrata in ogni cellula espressa in funzione della sua capacità di membrana) massima manifestata da cellule transfettate con il canale mutante rispetto a quella di cellule transfettate con il canale *wild type*: per hNa<sub>v</sub>1.1 Y790C la riduzione è del 90% ( $p=0.05^{-3}$ ), per hNa<sub>v</sub>1.1 R859C la riduzione è del 44% ( $p=0.05$ ), per hNa<sub>v</sub>1.1 M956T la riduzione è del 78% ( $p=0.01^{-2}$ ), per hNa<sub>v</sub>1.1 W1204R la riduzione è del 56% ( $p=0.002$ ), per hNa<sub>v</sub>1.1 R1245Q la riduzione è del 39% ( $p=0.05$ ), per hNa<sub>v</sub>1.1 V1366I la riduzione è del 58% ( $p=0.02^{-2}$ ) e per hNa<sub>v</sub>1.1 M1653K la riduzione è del 96% ( $p=0.003$ ) (Fig.4).



**Fig.4:** Valor medio della densità di corrente massima in cellule trasfettate con hNa<sub>v</sub>1.1 *wild type* ( $157.98 \pm 16.03$  pA/pF,  $n=39$ ), con hNa<sub>v</sub>1.1 Y790C ( $15.99 \pm 5.52$  pA/pF,  $n=12$ ), con hNa<sub>v</sub>1.1 R859C ( $88.14 \pm 25.2$  pA/pF,  $n=15$ ), con hNa<sub>v</sub>1.1 M956T ( $35.01 \pm 5.85$  pA/pF,  $n=14$ ), con hNa<sub>v</sub>1.1 W1204R ( $69.7 \pm 14.61$  pA/pF,  $n=21$ ), con hNa<sub>v</sub>1.1 R1245Q ( $96.45 \pm 15.2$  pA/pF,  $n=11$ ), con hNa<sub>v</sub>1.1 V1366I ( $67.01 \pm 8.83$  pA/pF,  $n=28$ ) e con hNa<sub>v</sub>1.1 M1653K ( $6.5 \pm 3.98$  pA/pF,  $n=6$ ). I valori sono espressi come media  $\pm$  SE. \* $p < 0.05$

Abbiamo quindi analizzato le proprietà biofisiche del canale *wild type* e dei mutanti, per valutare gli eventuali effetti delle mutazioni sulla funzionalità del canale.

Le registrazioni elettrofisiologiche delle correnti di sodio sono state effettuate applicando i protocolli per lo studio dei processi di attivazione, inattivazione e recupero dall'inattivazione veloce.



**Fig.5:** A) Curva I-V di cellule transfettate con hNav1.1 wt o mutante. B) Curva di voltaggio-dipendenza dell'attivazione: per hNav1.1  $V_{1/2h} = -22.3 \pm 0.1$  mV,  $K_a = 6.7 \pm 0.1$  (n=13); per hNav1.1 R859C  $V_{1/2h} = -20.3 \pm 0.2$ ,  $K_a = 8 \pm 0.2$  (n=7); per hNav1.1 M956T  $V_{1/2h} = -22.9 \pm 0.2$ ,  $K_a = 6.9 \pm 0.1$  (n=6); per hNav1.1 W1204R  $V_{1/2h} = -27.9 \pm 0.2$ ,  $P = 3.9 \times 10^{-3}$ ,  $K_a = 7.9 \pm 0.2$  (n=9); per hNav1.1 R1245Q,  $V_{1/2h} = -20.7 \pm 0.3$ ,  $K_a = 6.2 \pm 0.2$ ; (n=8); per hNav1.1 V1366I  $V_{1/2h} = -20.4 \pm 0.2$ ,  $K_a = 7.1 \pm 0.2$ ; (n=12). C) Curva di voltaggio-dipendenza dell'inattivazione: per hNav1.1  $V_{1/2h} = -61.1 \pm 0.2$  mV,  $K_h = 6.8 \pm 0.1$  mV (n=16); per hNav1.1 R859C  $V_{1/2h} = -60.4 \pm 0.2$  mV,  $K_h = 6.4 \pm 0.1$  mV (n=6); per hNav1.1 M956T  $V_{1/2h} = -60.5 \pm 0.1$  mV,  $K_h = 6.4 \pm 0.1$  mV (n=4); per hNav1.1 W1204R,  $V_{1/2h} = -68.8 \pm 0.9$  mV,  $P = 5.36 \times 10^{-4}$ ,  $K_h = 8.4 \pm 0.8$  mV (n=7); per hNav1.1 R1245Q,  $V_{1/2h} = -62 \pm 0.1$  mV,  $K_h = 5.5 \pm 0.1$  mV (n=6); per hNav1.1 V1366I  $V_{1/2h} = -55.8 \pm 0.6$  mV,  $K_h = 7.9 \pm 0.5$  mV (n=9). I dati sperimentali delle curve di voltaggio dipendenza sono stati sottoposti a fitting utilizzando l'equazione di Boltzmann. D) Curva della cinetica dei recuperi da un pre-pulso inattivante a 0 mV, della durata di 100 msec: per hNav1.1  $\tau_{REC} = 4.3 \pm 0.2$  ms (n=13); hNav1.1 R1916G,  $\tau_{REC} = 4.8 \pm 0.4$  msec (n=10); per hNav1.1 R859C  $\tau_{REC} = 3.8 \pm 0.3$  ms (n=5); per hNav1.1 M956T,  $\tau_{REC} = 4.8 \pm 0.1$  ms (n=6); per hNav1.1 W1204R,  $\tau_{REC} = 5.2 \pm 0.1$  ms (n=7); per hNav1.1 R1245Q,  $\tau_{REC} = 4.3 \pm 0.1$  ms (n=6); per hNav1.1 V1366I  $\tau_{REC} = 3.2 \pm 0.1$  ms (n=11)  $P = 0.0018$ . I risultati sono espressi come media  $\pm$  SE.

Nella figura n°5 sono descritte le proprietà biofisiche manifestate dal canale hNav1.1 *wild type* (cerchio blu), hNav1.1 R859C (rombo verde), hNav1.1 M956T (triangolo azzurro), hNav1.1 W1204R (quadrato ciano), hNav1.1 R1245Q (triangolo arancione), hNav1.1 V1366I

(stella viola). La caratterizzazione delle proprietà biofisiche di hNa<sub>v</sub>1.1 Y790C e hNa<sub>v</sub>1.1 M1653K, poiché le correnti mostrate da questi mutanti non sono sufficienti per effettuare un'analisi funzionale.

Per lo studio dell'attivazione, partendo da un potenziale di *holding* di -100 mV, sono stati somministrati degli impulsi depolarizzanti successivi, con gradini di 5 mV, fino ad arrivare ad un potenziale di +30 mV. Ad ogni impulso depolarizzante è associata la registrazione delle correnti di sodio che si generano attraverso la membrana plasmatica. L'intensità delle correnti viene poi convertita in conduttanza, applicando la legge generalizzata di Ohm, e normalizzata per il suo valore massimo (vedere i metodi). Il grafico che esprime la conduttanza in funzione del voltaggio somministrato costituisce la curva di voltaggio-dipendenza dell'attivazione.

La curva di voltaggio-dipendenza dell'attivazione di cellule transfettate con la hNa<sub>v</sub>1.1 *wild type* è sovrapposta a quella di cellule transfettate con i mutanti hNa<sub>v</sub>1.1 R859C, hNa<sub>v</sub>1.1 M956T, hNa<sub>v</sub>1.1 R1245Q, hNa<sub>v</sub>1.1 V1366I (Fig.5B). Abbiamo osservato, invece, uno spostamento di 5mV verso potenziali più negativi della curva di voltaggio-dipendenza dall'attivazione del mutante hNa<sub>v</sub>1.1 W1204R ( $V_{1/2h} = -27.9 \pm 0.2$ , n=9) rispetto al canale *wt* ( $V_{1/2h} = -22.3 \pm 0.1$  mV, n=13). Questo spostamento rende il canale disponibile all'apertura anche a potenziali più iperpolarizzati, lasciando ipotizzare un quadro di ipereccitabilità. Tuttavia, la mutazione W1204R ha effetto anche sulla voltaggio-dipendenza dall'inattivazione (Fig. 5C), con effetti che sembrano controbilanciare l'ipereccitabilità legata allo *shift* della voltaggio-dipendenza della curva di attivazione.

Per studiare l'inattivazione abbiamo fornito alle cellule dei pre-pulsi depolarizzanti della durata di 100 msec partendo da un potenziale di *holding* di -100 mV fino ad arrivare ad un potenziale di +30 mV. Ogni pre-pulso, che ha lo scopo di far aprire ma anche inattivare i canali, è seguito dalla misurazione del flusso di corrente che si manifesta al potenziale di 0 mV, cioè al potenziale di test. Tanto maggiore sarà l'entità del pre-pulso depolarizzante, tanto maggiore sarà la percentuale di canali inattivati e quindi tanto minore sarà la corrente misurata al potenziale di test. Le intensità di corrente, normalizzate al valore massimo, sono espresse in funzione del potenziale del pre-pulso e costituiscono la curva di voltaggio dipendenza dell'inattivazione.

La curva di voltaggio-dipendenza dell'inattivazione di cellule transfettate con la hNa<sub>v</sub>1.1 *wild type* è sovrapposta a quella di cellule transfettate con i mutanti hNa<sub>v</sub>1.1 R859C, hNa<sub>v</sub>1.1 M956T, hNa<sub>v</sub>1.1 R1245Q, hNa<sub>v</sub>1.1 V1366I ((Fig. 5C). La curva di voltaggio-dipendenza dell'inattivazione di cellule transfettate con hNa<sub>v</sub>1.1 W1204R ( $V_{1/2h} = -68.8 \pm 0.9$  mV, n=7) mostra, invece, uno spostamento di circa 7mV verso potenziali più negativi rispetto al canale



*wt* ( $V_{1/2h} = -61.1 \pm 0.2 \text{ mV}$ ,  $n=16$ ). Lo spostamento iperpolarizzante della curva di voltaggio dipendenza dell'inattivazione indica che il processo di inattivazione è favorito nel mutante.

Lo studio della cinetica di recupero dall'inattivazione è stato realizzato applicando uno stimolo depolarizzante a 0 mV della durata di 100 msec, che induce l'inattivazione veloce del canale, seguito da un ritorno di durata variabile al potenziale di *holding* e quindi dalla registrazione delle correnti di sodio che si manifestano al potenziale di test (0 mV). Maggiore sarà il tempo trascorso al potenziale di *holding*, maggiore sarà la percentuale di canali che è riuscita a uscire dal processo di inattivazione e quindi tanto maggiore sarà la corrente registrata al potenziale di test. Le intensità di corrente misurate al potenziale di test, normalizzate al valore massimo, espresse in funzione del tempo trascorso al potenziale di *holding* descrivono la curva di recupero dall'inattivazione.

La curva della cinetica di recupero dall'inattivazione di cellule trasfettate con la *hNa<sub>v</sub>1.1 wild type* è sovrapposta a quella di cellule trasfettate con i mutanti *hNa<sub>v</sub>1.1 R859C*, *hNa<sub>v</sub>1.1 M956T*, *hNa<sub>v</sub>1.1 W1204R*, *hNa<sub>v</sub>1.1 R1245Q* (Fig.5D): i valori assunti dalla  $\tau$  (costante di decadimento esponenziale) non sono infatti statisticamente diversi tra mutanti e *wt*. Abbiamo invece osservato una maggiore capacità di recuperare dall'inattivazione veloce nel mutante *hNa<sub>v</sub>1.1 V1366I*, che presenta una  $\tau$  significativamente diversa rispetto a quella del *wt*: per *hNa<sub>v</sub>1.1*  $\tau_{\text{REC}} = 4.3 \pm 0.2 \text{ ms}$  ( $n=13$ ), mentre per *hNa<sub>v</sub>1.1 V1366I*  $\tau_{\text{REC}} = 3.2 \pm 0.1 \text{ ms}$  ( $n=11$ ), con  $P=0.0018$ . Questo dato indica che il mutante, in seguito al fenomeno di inattivazione veloce, è in grado di tornare allo stato chiuso, pronto ad una nuova apertura, più velocemente rispetto al *wt*, ed è quindi consistente con una condizione di ipereccitabilità.

Nonostante ci siano delle modificazioni nelle proprietà funzionali consistenti con una condizione di ipereccitabilità, queste risultano essere trascurabili rispetto alla diminuzione di corrente che costituisce l'effetto preponderante, per cui l'effetto finale di queste mutazioni è una *loss of function*.

Poiché i mutanti in studio sono stati individuati in famiglie caratterizzate da elevata variabilità fenotipica, ci siamo chiesti se la *loss of function* per questi mutanti potesse essere legata a problemi di *misfolding*. E' stato recentemente dimostrato che, in alcuni casi, mutazioni epilettogene a carico di *Na<sub>v</sub>1.1* causano *loss of function* compromettendo il raggiungimento del corretto *folding* del canale (Rusconi et al., 2007; 2009). Questa condizione di *misfolding* determina, infatti, la ritenzione del canale mutante a livello del reticolo endoplasmatico e, in seguito, la sua degradazione. Questi processi portano al mancato raggiungimento della membrana plasmatica dove il canale dovrebbe esplicare la propria attività.

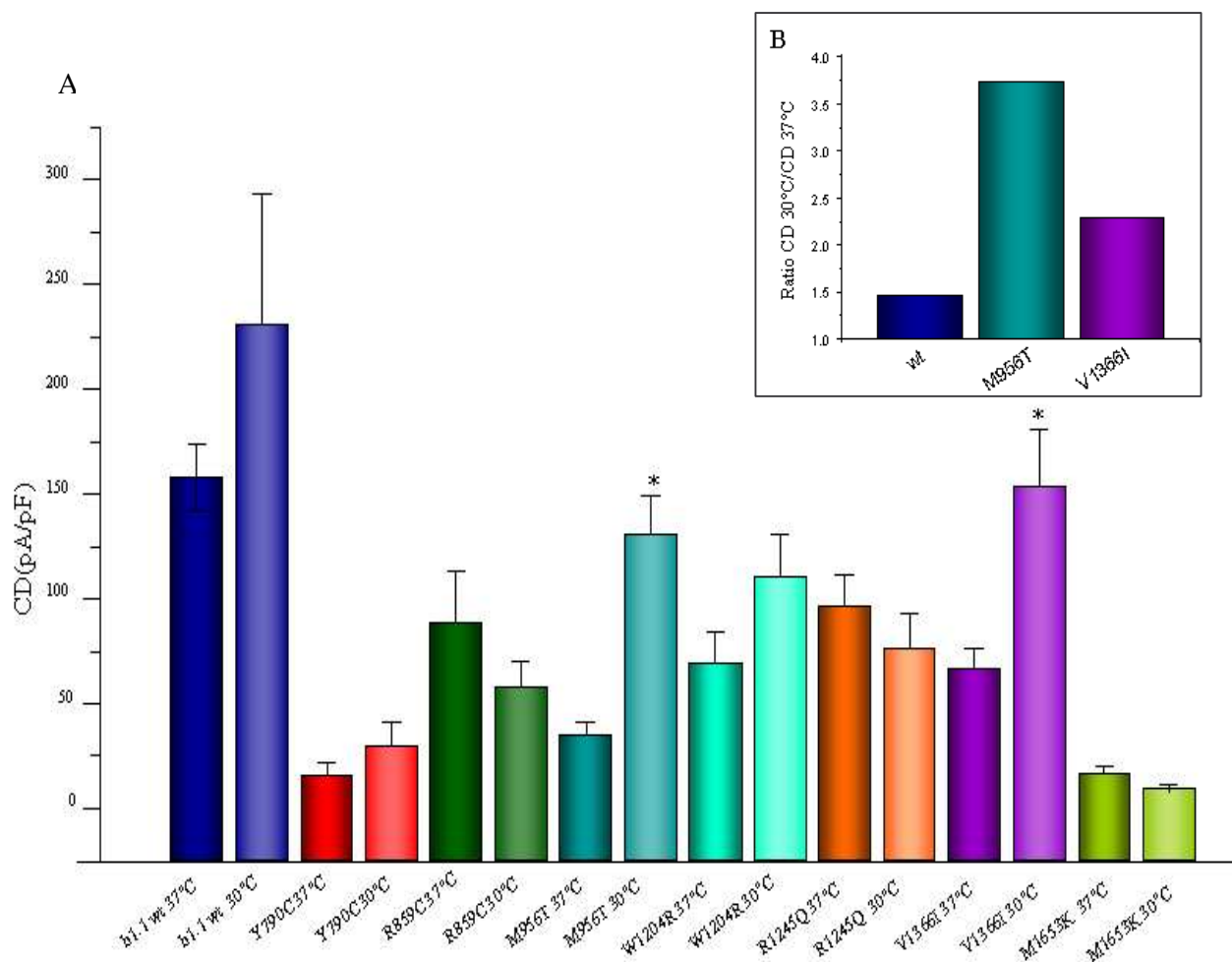
Il *rescue* di proteine difettive nel *folding* può essere ottenuto con diversi metodi, che vanno dall'abbassamento della temperatura di incubazione delle cellule transfettate all'utilizzo di *chaperones* chimici o farmacologici (Cobbold et al., 2003; Bernier et al., 2004).

Il meccanismo molecolare in base al quale la ridotta temperatura permette il recupero funzionale di questi mutanti non è ancora stato chiarito. Si suppone tuttavia che si tratti di un effetto cinetico legato al rallentamento dei processi che deriva dall'abbassamento della temperatura, che dovrebbe garantire alle proteine maggiori probabilità di strutturarsi correttamente e sfuggire al sistema di controllo qualità presente nel reticolo endoplasmatico.

Gli *chaperons* chimici sono sostanze a basso peso molecolare che interagiscono in modo non specifico con la proteina difettiva nel *folding*, mentre gli *chaperones* farmacologici sono composti che interagiscono in maniera selettiva con la proteina difettiva nel *folding*. Si ipotizza che l'interazione con tali composti rivesta un'azione stabilizzante sulle proteine mutanti, consentendogli di assumere la struttura tridimensionale corretta e, quindi, di sfuggire al sistema di controllo qualità presente nel reticolo endoplasmatico.

Come primo *screening* per individuare eventuali mutanti difettivi nel *folding* fra i mutanti da noi ingegnerizzati abbiamo incubato le cellule transfettate con il canale *wt* o mutante ad una temperatura di 30°C nelle 48 ore successive alla transfezione.

In queste condizioni abbiamo osservato un incremento statisticamente significativo della densità di corrente delle cellule transfettate con hNa<sub>v</sub>1.1 M956T (CD a 30°C =  $130.61 \pm 18.9$ , n= 14) e con hNa<sub>v</sub>1.1 V1366I (CD a 30°C =  $153.14 \pm 27.66$ , n= 13) (Fig.5A), rispettivamente di 3,7- e di 2,7-volte rispetto alle cellule transfettate con gli stessi mutanti ma incubate a 37°C (Fig 5B). Abbiamo osservato che anche l'espressione di hNa<sub>v</sub>1.1 *wt* è sensibile alla temperatura; infatti, l'incubazione a 30°C sembra incrementarne la densità di corrente (CD hNa<sub>v</sub>1.1 *wt* a 30°C è  $230 \pm 62.33$  pA/pF) ma l'incremento osservato non è statisticamente significativo. Questi dati lasciano dunque supporre che la mutazione M956T e la mutazione V1366I compromettano il processo di *folding* del canale, il che risulta nel mancato raggiungimento della membrana plasmatica.



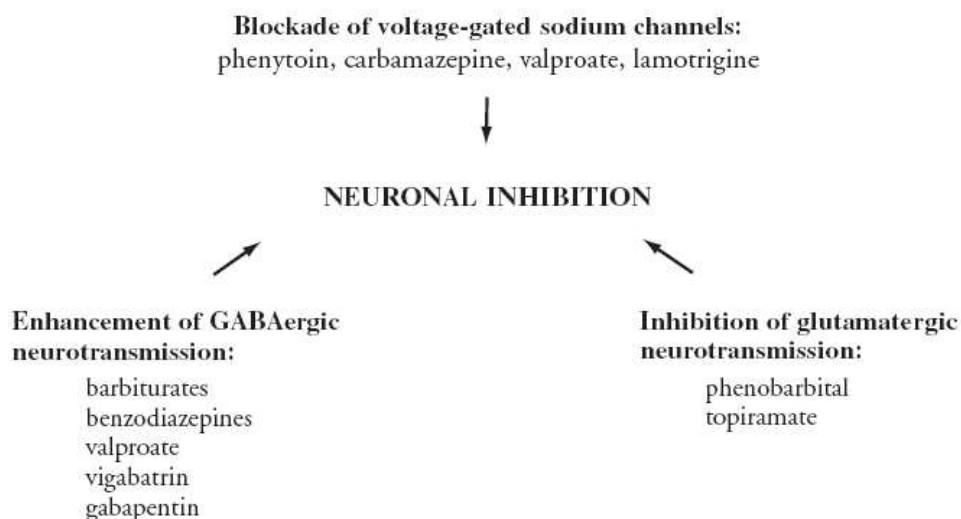
**Fig.5:** A) Valore medio della densità di corrente massima in cellule trasfettate con hNav1.1 *wild type* o mutante ed incubate a 30°C o a 37°C. I valori delle CD a 37°C sono gli stessi riportati in Fig.4. A 30°C i valori ottenuti sono i seguenti: hNav1.1 wt ( $230 \pm 62.33$  pA/pF, n=14), con hNav1.1 Y790C ( $29.46 \pm 11.63$  pA/pF, n=14) con hNav1.1 R859C ( $57.85 \pm 11.9$  pA/pF, n=6), con hNav1.1 M956T ( $130.61 \pm 18.9$  pA/pF, n=14), con hNav1.1 W1204R ( $110.61 \pm 20.24$  pA/pF, n=25), con hNav1.1 R1245Q ( $76.34 \pm 16.57$  pA/pF, n=10), con hNav1.1 V1366I ( $153.14 \pm 27.66$  pA/pF, n=13) e con hNav1.1 M1653K ( $9.52 \pm 2.17$  pA/pF, n=7). I valori sono espressi come media  $\pm$  SE. \* $p < 0.05$ . B). I dati relativi a hNav1.1 wt, hNav1.1 M956T e hNav1.1 V1366I sono espressi come rapporto CD 37°C/CD30°C.

Questi dati dimostrano, infatti, che quando hNav1.1 M956T e hNav1.1 V1366I raggiungono la membrana plasmatica, grazie all'abbassamento della temperatura che secondo la nostra ipotesi agevolerebbe il *folding*, sono in grado di generare delle correnti di sodio paragonabili a quelle del canale *wild type*.

Anderson et al. hanno recentemente dimostrato l'esistenza di mutanti di *folding* il cui ripristino può essere ottenuto con l'uso di *chaperones* farmacologici, anche nel caso in cui la temperatura non riesca a favorire il raggiungimento della forma nativa (Anderson et al., 2006).

Abbiamo quindi deciso di valutare l'effetto di alcuni *chaperones* farmacologici sui nostri mutanti. Per tale scopo abbiamo scelto i seguenti *chaperones*: fenitoina (100  $\mu$ M), carbamazepina (100  $\mu$ M), topiramato (100  $\mu$ M), valproato (30  $\mu$ M) e veratridina (100  $\mu$ M).

La fenitoina e la carbamazepina sono due classici anti-epilettici che bloccano le correnti dei canali voltaggio-dipendenti del sodio. Entrambi sono composti di natura lipofilica che, dopo aver attraversato la membrana plasmatica, si legano in corrispondenza del segmento S6 del dominio IV della subunità  $\alpha$ , ostruendo così dall'interno il poro del canale (Catterall, 2000). Questi farmaci sono già stati utilizzati per ottenere il *rescue* di due mutanti difettivi nel *folding* di hNa<sub>v</sub>1.1 (Rusconi et al., 2007; 2009). Fenitoina e carbamazepina sono efficaci per il trattamento di crisi tonico-cloniche parziali e generalizzate, ma non contro le crisi di assenza. Altri farmaci anti-epilettici bloccano i canali voltaggio-dipendenti del sodio con diversi gradi di efficacia, ma agiscono anche su altri *target* molecolari (Fig.6); comparati a fenitoina e carbamazepina, questi farmaci sono in grado di contrastare diversi tipi di crisi. Ad esempio il valproato è efficace anche contro le crisi di assenza e le crisi miocloniche (Loscher et al., 2002). Il meccanismo molecolare alla base dell'azione di questo farmaco ancora non è chiaro; tuttavia, evidenze sperimentali indicano che, oltre ad aumentare il *turnover* del GABA (*gamma-aminobutyric acid*), il valproato inibisce i canali voltaggio-dipendenti del sodio (Loscher et al., 2002). Anche il topiramato, oltre ad essere grado di bloccare i canali voltaggio-dipendenti del sodio (Shank et al., 2008), esplica la sua funzione di anti-epilettico tramite altri meccanismi, ad esempio modificando la trasmissione sinaptica mediata da aminoacidi eccitatori (Gryder and Rogawski, 2003; Qian and Noebels, 2003).

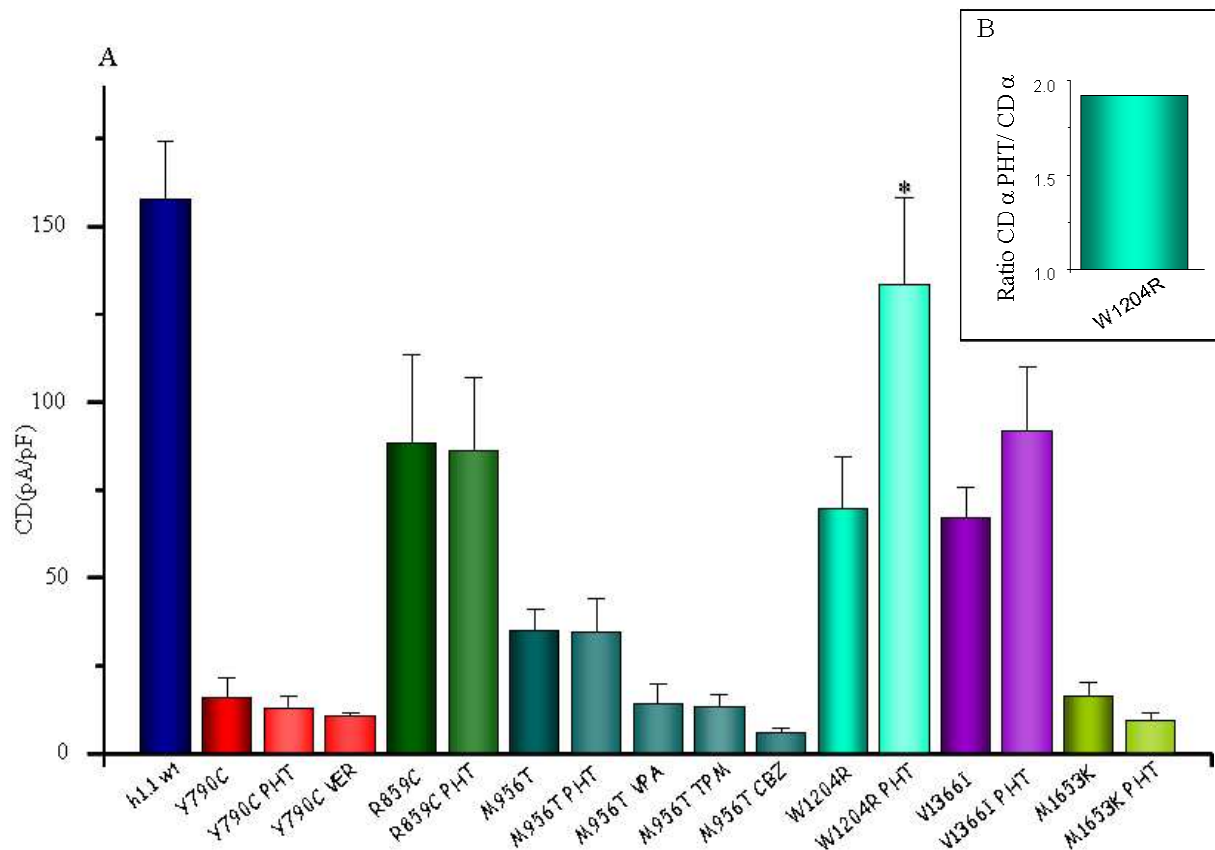


**Fig.6:** Principali meccanismi di azione dei farmaci antiepilettici.

Infine, nel tentativo di ottenere il *rescue* di mutanti difettivi nel *folding*, abbiamo testato l'effetto della veratridina, una neurotossina liposolubile che promuove l'apertura del canale. Il

sito di legame di questa neurotossina al canale è lo stesso degli anestetici locali, cioè il segmento S6 del dominio DIV (Wang and Wang, 2003).

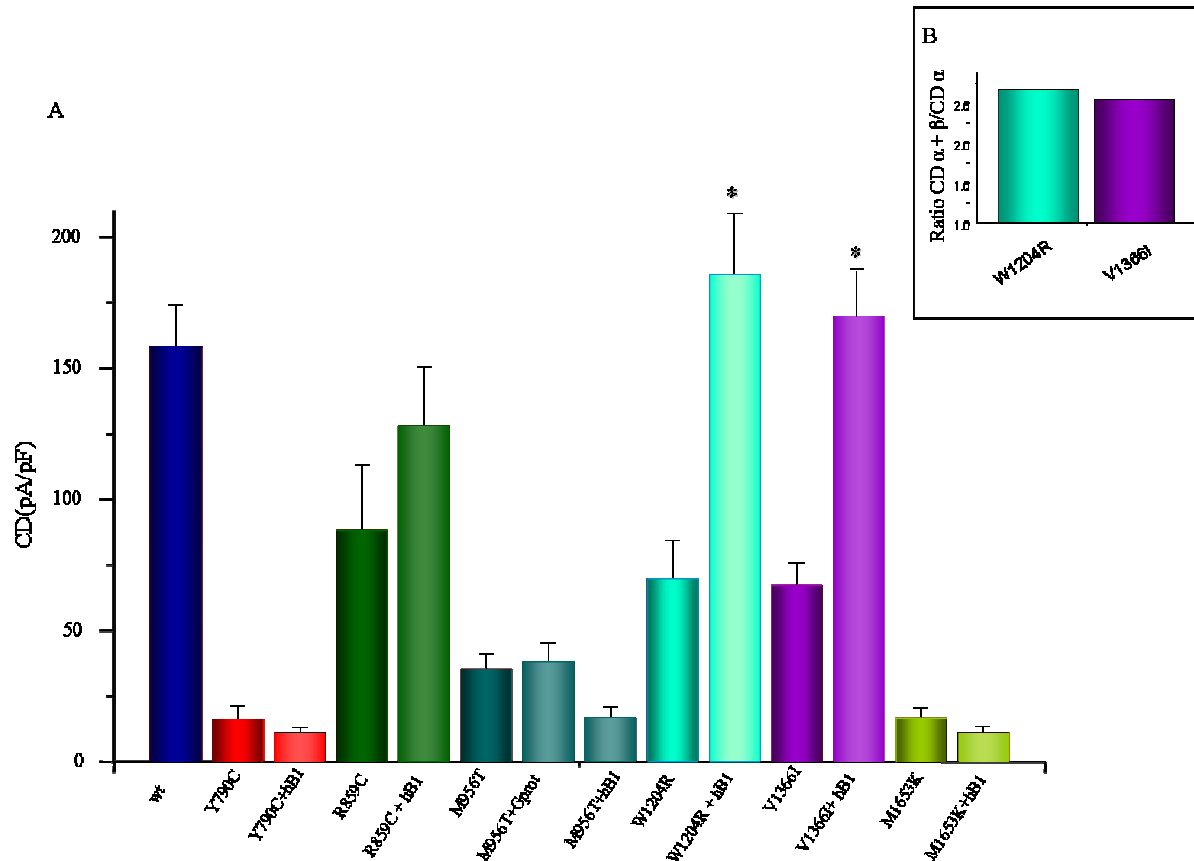
Le cellule transfettate sono state incubate con i diversi *chaperones* per 48 ore, trascorse le quali si è quindi provveduto a sostituire il terreno con un medium standard un paio di ore prima di effettuare le registrazioni elettrofisiologiche. La sostituzione del terreno si è resa necessaria soprattutto nel caso di utilizzo degli *chaperones* farmacologici che inducono il blocco delle correnti di sodio.



**Fig.7:** A) Valore medio della densità di corrente massima in cellule transfettate con hNa<sub>v</sub>1.1 *wild type* o mutante ed incubate in presenza o meno di fenitoina (PHT), veratridina (VER), valproato (VPR), topiramato (TPM) e carbamazepina (CBZ). I valori delle CD di cellule non incubate con i diversi *chaperones* sono gli stessi riportati in Fig.4. Le CD ottenute in seguito all'incubazione delle cellule con PHT sono le seguenti: con hNa<sub>v</sub>1.1 Y790C ( $12 \pm 3.32$  pA/pF, n=7) con hNa<sub>v</sub>1.1 R859C ( $87.37 \pm 20.72$  pA/pF, n=8), con hNa<sub>v</sub>1.1 M956T ( $34.78 \pm 9.4$  pA/pF, n=14), con hNa<sub>v</sub>1.1 W1204R ( $133.6 \pm 24.6$  pA/pF, n=7), con hNa<sub>v</sub>1.1 V1366I ( $91.78 \pm 18.08$  pA/pF, n=8) e con hNa<sub>v</sub>1.1 M1653K ( $9.46 \pm 4$  pA/pF, n=8). La CD ottenuta in seguito all'incubazione con VER di cellule transfettate con il mutante hNa<sub>v</sub>1.1 Y790C è  $10.6 \pm 1.14$  pA/pF, con n= 3. La CD di cellule transfettate con il mutante hNa<sub>v</sub>1.1 M956T è  $14.06 \pm 6$  pA/pF (n=13) in caso di incubazione con VPR,  $13.44 \pm 3.58$  pA/pF (n=9) in caso di incubazione con TPM,  $5.99 \pm 1.24$  pA/pF (n=12) in caso di incubazione con CBZ. I valori sono espressi come media  $\pm$  SE. \*p<0.05. B). I dati relativi a hNa<sub>v</sub>1.1 W1204R è espressa come rapporto CD cellule incubate con fenitoina/CD incubate senza fenitoina.

L'incubazione con fenitoina è in grado di determinare un incremento statisticamente significativo di 1.9 volte della densità di corrente massima del mutante hNa<sub>v</sub>1.1 W1204R (p=0.03), dimostrando come questo *chaperon* è in grado di stabilizzarne il *folding*. L'incubazione con fenitoina non è in grado di indurre, invece, il *rescue* dei mutanti hNa<sub>v</sub>1.1

Y790C, hNa<sub>v</sub>1.1 R859C, hNa<sub>v</sub>1.1 M956T, hNa<sub>v</sub>1.1 V1366I e hNa<sub>v</sub>1.1 M1653K. Tramite le incubazioni con carbamazepina, topiramato e valproato, il cui effetto è stato testato sul mutante hNa<sub>v</sub>1.1 Y790C, e veratridina, il cui effetto è stato testato su hNa<sub>v</sub>1.1 M956T, non è stato possibile ottenere alcun *rescue* (Fig.7).



**Fig.8: A)** Valore medio della densità di corrente massima in cellule trasfettate con hNa<sub>v</sub>1.1 *wild type* o mutante, coespresso o meno con la subunità accessoria β1. I valori delle CD di cellule trasfettate solo con la subunità α (Fig.4). Le CD ottenute con la cotrasfezione della subunità β1 sono le seguenti: con hNa<sub>v</sub>1.1 Y790C+ h β1 (10.97± 2.03 pA/pF, n=8) con hNa<sub>v</sub>1.1 R859C+ h β1 (128.04± 27.7 pA/pF, n=8), con hNa<sub>v</sub>1.1 M956T+ h β1 (38.04± 7.46 pA/pF, n=10), con hNa<sub>v</sub>1.1 W1204R+ h β1 (185.53± 23.55 pA/pF, n=7), con hNa<sub>v</sub>1.1 V1366I+ h β1 (169.95± 17.24 pA/pF, n=9) e con hNa<sub>v</sub>1.1 M1653K+ h β1 (10.81±3.98 pA/pF, n=6). I valori sono espressi come media± SE. \*p<0.05. **B).** I dati relativi a hNa<sub>v</sub>1.1 W1204R e hNa<sub>v</sub>1.1 V1366I sono espressi come rapporto CD ottenuta con cellule cotrasfettate con la subunità β1/CD di cellule trasfettate con la sola subunità α.

Avendo Rusconi et al. recentemente dimostrato (2007; 2009) che l'interazione di mutanti di *folding* dell'isoforma Na<sub>v</sub>1.1 del canale voltaggio-dipendente del sodio con le subunità accessorie β è in grado di ripristinarne la funzionalità, abbiamo deciso di valutare l'effetto della coespressione della subunità β1 con i mutanti da noi ingegnerizzati. Uno dei siti di interazione con la subunità ausiliaria β1 è al livello della sequenza compresa tra gli aminoacidi K1846 e R1886 nell'estremità C-terminale della subunità α (Spampanato et al. nel 2004).

Le densità di corrente manifestate dalle cellule co-transfettate con le subunità  $\alpha$  mutante e la subunità  $\beta 1$  risultano aumentate in maniera statisticamente significativa, rispetto alle densità di corrente osservate in cellule transfettate con la sola subunità  $\alpha$ , per i mutanti hNa<sub>v</sub>1.1 W1204R ( $p=0.04^{-2}$ ) e hNa<sub>v</sub>1.1 V1366I ( $p=0.02^{-4}$ ) (fig.8 A): l'interazione con la subunità  $\beta 1$  aumenta la CD di cellule transfettate con hNa<sub>v</sub>1.1 W1204R di 2,7-volte, con hNa<sub>v</sub>1.1 V1366I di 2,5-volte. La subunità  $\beta 1$ , dunque, permette un totale ripristino dell'attività dei mutanti hNa<sub>v</sub>1.1 W1204R e hNa<sub>v</sub>1.1 V1366I che, grazie all'interazione con questa subunità accessoria, sono in grado di generare correnti paragonabili a quelle del canale *wild type* (hNa<sub>v</sub>1.1 wt CD=  $157.98 \pm 16.03$  pA/pF, n=39; hNa<sub>v</sub>1.1 W1204R+ h  $\beta 1$  CD=  $185.53 \pm 23.55$  pA/pF, n=7; hNa<sub>v</sub>1.1 V1366I+ h  $\beta 1$  CD=  $169.95 \pm 17.24$  pA/pF, n=9).

I dati ottenuti dalla caratterizzazione dei mutanti hNa<sub>v</sub>1.1M956T, hNa<sub>v</sub>1.1R1204R e hNa<sub>v</sub>1.1 V1366I confermano che i difetti di *folding* possono rappresentare un meccanismo patogenetico comune nelle epilessie familiari. I nostri risultati, infatti, sono consistenti con quelli pubblicati da Rusconi et al., relativi alle mutazioni epiletogene M1841T e R1916G di hNa<sub>v</sub>1.1 che analogamente causano difetti di *folding* (Rusconi et al., 2007; 2009). Inoltre, i nostri dati hanno messo in luce il fatto che le mutazioni compromettenti il *folding* non siano localizzate in *hot spots* o in un dominio specifico, ma siano distribuite in diversi domini del canale.

DISCUSSIONE  
progetto “MUTANTI *FOLDING*  
*DEFECTIVE*”



La GEFS+ (*generalized epilepsy with febrile seizures plus*) è un'epilessia familiare caratterizzata da trasmissione autosomica dominante, contraddistinta da notevole variabilità fenotipica anche all'interno della stessa famiglia. Gli affetti mostrano infatti fenotipi estremamente diversi, che vanno da casi quadri clinici molto lievi (convulsioni febbrili tipiche, FS, o che persistono oltre i sei anni di età, FS+), a quadri clinici moderatamente gravi (FS+ associate a crisi di assenza/crisi miocloniche/crisi atoniche o epilessia mioclonica astatica), a quadri clinici estremamente gravi (SMEI, *severe myoclonic epilepsy of infancy*). In base ai geni che presentano le mutazioni responsabili della sua insorgenza si distinguono tre classi di GEFS+: la GEFS+ di tipo I, in cui le mutazioni sono localizzate nel gene SCN1B, codificante per la subunità  $\beta 1$  del canale voltaggio dipendente del sodio; la GEFS+ di tipo II, in cui le mutazioni sono localizzate nei geni SCN1A e SCN2A, codificanti per le isoforme Na<sub>v</sub>1.1 e Na<sub>v</sub>1.2 dei canali voltaggio dipendenti del sodio; la GEFS+ di tipo III, in cui le mutazioni sono localizzate nel gene GABRG2, codificante per la subunità  $\gamma_2$  del recettore GABA<sub>A</sub>.

In questo studio abbiamo focalizzato la nostra attenzione su mutazioni a carico di Na<sub>v</sub>1.1, il *target* di mutazioni epilettogene più frequentemente colpito. In particolare, abbiamo scelto questo *target* perché recentemente è stato descritto un meccanismo patogenetico legato a mutazioni di questa isoforma che potrebbe spiegare l'elevata variabilità fenotipica presente all'interno delle famiglie GEFS+ (Rusconi et al., 2007; 2009). Rusconi et al. hanno dimostrato che le mutazioni M1841T e R1916G a carico di Na<sub>v</sub>1.1 portano ad una perdita di funzionalità del canale tramite la compromissione del *folding*. Le proteine che non riescono a raggiungere la propria forma nativa, infatti, vengono riconosciute come *misfolded* dal sistema di controllo qualità del reticolo endoplasmatico e, quindi, vengono trattenute in questo compartimento e successivamente degradate. Così, il canale mutato non raggiunge il compartimento di destinazione, la membrana plasmatica, e non può esplicare la propria funzione. Tuttavia, l'interazione *in vitro* di questi mutanti con proteine accessorie o modulatrici, come la subunità  $\beta$ , può essere in grado di ripristinarne la funzionalità. Rusconi et al. hanno ipotizzato che anche *in vivo* l'interazione con proteine accessorie renda possibile il ripristino funzionale di questi mutanti. La variabilità individuale nell'espressione di tali proteine accessorie, alla quale oltretutto si somma l'espressione differenziale che esse presentano nei diversi sottotipi neuronali, inciderebbe sulla capacità di queste proteine di interagire col canale mutante e di consentirne il *rescue*. Infatti, la presenza di mutazioni o polimorfismi nei promotori e/o nelle sequenze codificanti delle proteine accessorie condizionerebbe il livello di espressione e l'affinità di interazione con la subunità  $\alpha$ , il che si

ripercuoterebbe sulla capacità di indurre un recupero funzionale del canale mutante e quindi, in ultima analisi, sulla gravità del fenotipo.

Lo scopo principale del nostro progetto è valutare se questo meccanismo patogenetico è comune alle epilessie familiari. Inoltre abbiamo voluto verificare se le mutazioni che causano problemi di *folding* sono localizzate prevalentemente in particolari *hot spots* o sono distribuite omogeneamente nel canale, poiché le mutazioni pubblicate fino ad oggi sono entrambe localizzate nella zona C-terminale del canale.

L'analisi di *screening* genetico e la consultazione dei dati presenti in letteratura hanno consentito la selezione di diverse famiglie GEFS+, caratterizzate da variabilità fenotipica particolarmente elevata e dalla presenza di pazienti affetti da SMEI, con mutazioni missenso di Na<sub>v</sub>1.1 distribuite in segmenti e domini diversi del canale.

Abbiamo ingegnerizzato le mutazioni selezionate nell'isoforma umana di Na<sub>v</sub>1.1 e le abbiamo espresse transientemente in cellule tsA201. L'analisi funzionale è stata condotta attraverso esperimenti elettrofisiologici di *patch clamp* in configurazione *whole cell*. Sono state eseguite registrazioni elettrofisiologiche finalizzate a valutare la densità di corrente e le principali proprietà biofisiche, confrontando il comportamento del canale mutante con quello del *wild type*.

L'espressione in cellule tsA201 di hNa<sub>v</sub>1.1 Y790C, hNa<sub>v</sub>1.1 R859C, hNa<sub>v</sub>1.1 M956T, hNa<sub>v</sub>1.1 W1204R, hNa<sub>v</sub>1.1 R1245Q, hNa<sub>v</sub>1.1 V1366I e hNa<sub>v</sub>1.1 M1653K ha rivelato che questi mutanti mostrano una perdita di funzione, in alcuni casi totale (mutazioni Y790C e M1653K), in altri parziale (mutazioni R859C, M956T, W1204R, R1245Q e V1366I). Il calo della densità di corrente di sodio dei canali mutanti rispetto al *wild type* osservato è consistente con i dati presenti in letteratura relativi alla maggior parte dei mutanti SMEI e GEFS+. Questa condizione di ipoeccitabilità potrebbe sembrare in contrasto con una patologia epilettica, caratterizzata da ipereccitabilità. Tuttavia, i dati ottenuti utilizzando due modelli murini di SMEI, *knock out* e *knock in* (mutazione Arg1407X) per SCN1A, indicano che Na<sub>v</sub>1.1 è l'isoforma prevalentemente espressa in alcuni tipi di interneuroni inibitori (Yu et al., 2006; Ogiwara et al., 2007). Quindi, questa apparente contraddizione può essere spiegata supponendo che gli effetti della perdita di funzione di hNa<sub>v</sub>1.1 siano prevalentemente a carico degli interneuroni e che l'elevata ipereccitabilità osservata nell'epilessia potrebbe essere il risultato della diminuzione del tono GABA-ergico inibitorio.

La caratterizzazione delle principali proprietà biofisiche, voltaggio-dipendenza dall'attivazione e dall'inattivazione e recupero dall'inattivazione veloce, dei mutanti hNa<sub>v</sub>1.1

R859C, hNa<sub>v</sub>1.1 M956T e hNa<sub>v</sub>1.1 R1245Q ha rivelato che questi mutanti mostrano un comportamento simile a quello del canale *wt*. Le mutazioni W1204R e V1366I comportano, invece, alcune alterazioni nelle proprietà biofisiche del canale. hNa<sub>v</sub>1.1 W1204R mostra uno *shift*, verso potenziali più negativi, della curva di voltaggio dipendenza dall'attivazione e dall'inattivazione; lo *shift* di entrambe le curve fa' sì che il canale mutante si apra e chiuda a potenziali più iperpolarizzati rispetto al canale *wild type*. hNa<sub>v</sub>1.1 V1366I mostra, invece, un recupero più' veloce dall'inattivazione veloce. Questo dato indica che il mutante, in seguito al fenomeno di inattivazione veloce, è in grado di tornare allo stato chiuso, pronto ad una nuova apertura, più velocemente rispetto al *wt*, ed è quindi consistente con una condizione di ipereccitabilità. Tuttavia, si tratta ad ogni modo di una modificazione di entità trascurabile, in quanto l'effetto preponderante di questa mutazione comporta una perdita di funzione del canale hNa<sub>v</sub>1.1. Non è stato possibile caratterizzare i mutanti hNa<sub>v</sub>1.1 Y790C e hNa<sub>v</sub>1.1 M1653K, poiché le correnti mostrate da questi mutanti non sono sufficienti per effettuare un'analisi funzionale.

Il mantenimento a 30°C, invece che a 37°C, della temperatura di incubazione delle cellule transfettate ha consentito il totale ripristino funzionale dei mutanti hNa<sub>v</sub>1.1M956T e hNa<sub>v</sub>1.1 V1366I. Il recupero funzionale ottenuto con incubazione a bassa temperatura è tipico dei mutanti difettivi nel *folding*, che non sono in grado di raggiungere la corretta struttura tridimensionale. L'azione benefica esercitata della ridotta temperatura sul *folding* è ancora oggi oggetto di discussione. L'ipotesi corrente sostiene che si tratti di un effetto cinetico in base al quale il rallentamento dei processi, dovuto alla più bassa temperatura, garantirebbe alla proteina mutata maggiori probabilità di strutturarsi in maniera corretta (Bernier et al., 2004). La compromissione del *folding* determina la ritenzione della proteina mutata nel reticolo endoplasmatico ad opera del sistema di controllo qualità e, di conseguenza, la sua successiva degradazione; ciò impedisce alle proteine *misfolded* di raggiungere il compartimento di destinazione, nel caso dei canali la membrana plasmatica, ed esercitare la sua attività. Rusconi et al. hanno dimostrato l'esistenza di mutanti di hNa<sub>v</sub>1.1 difettivi nel *folding*, il cui ripristino funzionale è reso possibile dall'incubazione a bassa temperatura; ipotizziamo, quindi, che anche le mutazioni M956T e V1366I causino la compromissione del raggiungimento della struttura nativa, portando così alla *loss of function* del canale da noi osservata. Questa, infatti, non può essere attribuita ad alterazioni della proprietà biofisiche del canale, poichè nel caso di hNa<sub>v</sub>1.1 M956T queste sono inalterate rispetto al *wt*, mentre nel caso di hNa<sub>v</sub>1.1 V1366I contribuirebbero ad una condizione di ipereccitabilità.

Il ripristino funzionale di mutanti con alterazioni nel processo di *folding* è ottenuto anche attraverso l'incubazione con *chaperon* chimici o farmacologici (Cobbold et al., 2003; Bernier et al., 2004), cioè con sostanze a basso peso molecolare che interagiscono in maniera rispettivamente non specifica o specifica con la proteina mutata. Da queste interazioni deriverebbe un effetto stabilizzatore sul *folding*, che consentirebbe alla proteina mutata di sfuggire al sistema di controllo qualità del reticolo endoplasmatico. Poiché Anderson et al. hanno recentemente dimostrato l'esistenza di mutanti di *folding* di un canale per il potassio il cui ripristino può essere ottenuto con l'uso di *chaperones* farmacologici, anche nel caso in cui la temperatura non riesca a favorire il raggiungimento della forma nativa (Anderson et al., 2006), abbiamo pensato di provare ad individuare altri eventuali mutanti di *folding*, fra quelli ingegnerizzati che non vengono aiutati dall'incubazione a bassa temperatura, avvalendoci dell'utilizzo di *chaperones* farmacologici.

L'incubazione con fenitoina, un farmaco antiepilettico liposolubile, ha permesso di identificare un altro mutante di *folding*; essa determina, infatti, un aumento statisticamente significativo della densità di corrente del mutante hNav<sub>v</sub>1.1 W1204R, mentre non ha effetto sugli altri mutanti. Grazie all'interazione con questo *chaperon*, che stabilizza la struttura del canale mutante, hNav<sub>v</sub>1.1 W1204R è in grado di eludere il sistema di controllo qualità e raggiungere la membrana plasmatica dove esplica la propria funzione normalmente. Non è chiaro il motivo per cui questo farmaco non è in grado di ripristinare anche la funzionalità degli altri due mutanti difettivi nel *folding* individuati, hNav<sub>v</sub>1.1 M956T e hNav<sub>v</sub>1.1 V1366I.

Dal momento che Rusconi et al. hanno dimostrato come il ruolo di *chaperon* possa anche essere svolto da proteine accessorie (Rusconi et al 2007; 2009), abbiamo voluto valutare l'effetto della coespressione con la subunità  $\beta 1$  con i nostri mutanti. Questa è in grado di interagire con la della subunità  $\alpha$  grazie alla presenza di un sito di interazione nella regione C-terminale di quest'ultima (Spampanato et al. nel 2004).

La coespressione della subunità  $\beta 1$  comporta un aumento della densità di corrente nel caso dei mutanti hNav<sub>v</sub>1.1 W1204R e hNav<sub>v</sub>1.1 V1366I, ripristinando completamente la loro attività.

I risultati da noi ottenuti sono, dunque, concordi con l'ipotesi di Rusconi et al., secondo cui l'alterazione del *folding* può essere alla base della perdita di funzione osservata in alcuni mutanti; questo meccanismo patogenetico potrebbe spiegare l'elevata variabilità fenotipica riscontrata nelle famiglie GEFS+. L'individuazione di tre nuove mutazioni (M956T, W1204R e V1366I) di Na<sub>v</sub>1.1, associate a famiglie GEFS+ in cui è presente un *range* piuttosto vario di fenotipi e legate alla compromissione del meccanismo di *folding*, conferma che il mancato

raggiungimento della forma nativa rappresenta un meccanismo patogenetico comune alle epilessie familiari.

La variabilità individuale nell'espressione di proteine accessorie in grado di aiutare mutanti *misfolded* a ripiegarsi correttamente e sfuggire al controllo di qualità del reticolo endoplasmatico può, quindi, influire sulla gravità del fenotipo: si può ipotizzare, ad esempio, che un fenotipo grave come quello SMEI sia il risultato di una minore efficacia nell'interazione del canale mutante difettivo nel *folding* con le proteine accessorie che funzionano da *chaperones*. L'efficacia di interazione può essere influenzata da mutazioni/polimorfismi nei promotori/sequenze codificanti delle proteine accessorie, dalla modulazione a carico delle proteine accessorie e dall'alterazione di altre proteine che interagiscono con queste. Emerge, quindi, uno scenario complesso con numerosi elementi in gioco, il che giustifica la complessità dei quadri clinici osservati nella GEFS+.

Inoltre, mentre M1841T e R1916G, le prime mutazioni di Nav1.1 che causano difetti di *folding* individuate (Rusconi et al., 2007;2009), sono localizzate entrambe nella zona C-terminale del canale, le mutazioni che abbiamo caratterizzato sono distribuite in segmenti e domini diversi del canale. La mutazione M956T è situata nel secondo dominio S5; la mutazione W1204R si trova nel *loop* citoplasmatico che unisce dominio II e dominio III; la mutazione V1366I è localizzata nel segmento 5 del terzo dominio. Quindi, i nostri risultati evidenziano come le mutazioni che comportano il mancato raggiungimento del corretto *folding* del canale non siano localizzate in particolari *hot spots*, ma siano distribuite omogeneamente.

## BIBLIOGRAFIA

- Abriel H., Kass R.S. "Regulation of the voltage gated sodium channel  $\text{Na}_v1.5$  by interacting proteins" *Trends Cardio Med* 2005; 15:35-40
- Agrawal N., Alonso A., Ragsdale D.S. "Increased persistent sodium currents in rat entorhinal cortex layer V neurons in a post-status epilepticus model of temporal lobe epilepsy". *Epilepsia* 2003; 44: 1601–04.
- Ahn M., Beacham D., Westenbroek R.E., Scheuer T., Catterall W.A. "Regulation of  $\text{Na}_v1.2$  channels by brain derived neurotrophic factor,  $\text{trkB}$ , and associated Fyn kinase" *J Neurosci* 2007; 27(43): 11533-11542
- Anderson P.A.V. and Greenberg R.M. "Phylogeny of ion channels: clues to structure and function". *Comp Biochem Physiol Part B* 2001; 129:17-28
- Allouis M., Le Bouffant F., Wilders R., Peroz D., Schott J.J., Noireaud J. "14-3-3 is a regulator of the cardiac voltage-gated sodium channel  $\text{Nav}1.5$ ." *Circ Res* 2006; 98:1538–46.
- Armstrong CM (1981) Sodium channels and gating currents. *Physiol Rev* 61:644-683.
- Aronica E., Yankaya B., Troost D., van Vliet E.A. "Lopes da Silva FH, Gorter JA. Induction of neonatal sodium channel II and III  $\alpha$ -isoform mRNAs in neurons and microglia after status epilepticus in the rat hippocampus". *Eur J Neurosci* 2001; **13**: 1261–66.
- Ashcroft F.M. "From molecule to malady". *Nature* 2006; 440: 440—447.
- Audenaert D., Claes L., Ceulemans B., Lofgren A., Van Broeckhoven C., De Jonghe P. "A deletion in *SCN1B* is associated with febrile seizures and early-onset absence epilepsy." *Neurol* 2003; 61: 854- 85
- Avanzini G., Franceschetti S. "Cellular biology of epileptogenesis". *Lancet Neurol* 2003; 2: 33-42
- Avanzini G., Franceschetti S., Mantegazza M. "Epileptogenic channelopathies: experimental models of human pathologies". *Epilepsia* , 2007; 48 Suppl 2:51-64.
- Baulac S., Gourfinkel-An I., Nabbout R., Huberfeld G., Serratosa J., Leguern E., Baulac M. "Fever, genes, and epilepsy" *The Lancet* 2004;3: 421-430
- Beacham D., Ahn M., Catterall W.A., Scheuer T. "Sites and molecular mechanisms of modulation of  $\text{Na}_v1.2$  channels by Fyn tyrosine kinase" *J Neurosci* 2007; 27: 11543-11551
- Benitah JP, Chen Z, Balser JR, Tomaselli GF, Marban E (1999) Molecular dynamics of the sodium channel pore vary with gating: interactions between P-segment motions and inactivation. *J Neurosci* 19:1577-1585.
- Bennett E.S., Urcan M.S., Tinkle S.S., Koszowski A.G., Levinson S.R. "Contribution of sialic acid to the voltage-dependence of sodium channel gating: a possible electrostatic effect". *J Gen Physiol* 1997; 109: 327-343
- Bennett E.S. "Isoform-specific effects of sialic acid on voltage-dependent  $\text{Na}^+$  channel gating: functional sialic acids are localized to the S5-S6 loop of domain I" *J Physiol* 2002; 538: 675-690
- Berkovic S.F., Heron S.E., Giordano L., Marini C., Guerrini R., Kaplan R.E., Gambardella A., Steinlen O.K., Grinton B.E., Dean J.T., Bordo L., Hodgson B.L., Yamamoto T., Mulley J.C., Zara F., Scheffer I.E. "Benign familial neonatal-infantile seizures: characterization of a new sodium channelopathy" *Ann Neur.* 2004; 55: 550-557

- Bernier V., Lagace M., Bichet D.G., Bouvier M. "Pharmacological chaperones: potential treatment for conformational diseases" *Trends in Endocrin Metabol* 2004; 15: 222-227
- Biskup C., Zimmer T., Benndorf K. "FRET between cardiac Na<sup>+</sup> channel subunits measured with a confocal microscope and a streak camera" *Nature Biotechnol* 2004; 22:220-224
- Black J.A., Yokoyama S., Higashida H., Ransom B.R., Waxman S.G. "Sodium channel mRNAs I, II and III in the CNS: cell-specific expression". *Brain Res* 1994; 22: 275-289
- Black J.A., Liu S., Waxman S.G. "Sodium channel activity modulates multiple functions in microglia." *Glia* 2009; 57: 1072-81
- Blumenfeld H., Lampert A., Klein J.P. "Role of hippocampal sodium channel Nav1.6 in kindling epileptogenesis". *Epilepsia* 2009; 50: 44-55.
- Boixel C., Gavillet B., Rougier J.S., Abriel H. "Aldosterone increases voltage-gated sodium current in ventricular myocytes." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H2257-66
- Boyle L.H., Gillingham A.K., Munro S., Trowsdale J. "Selective export of HLA-F by its cytoplasmic tail." *J Immunol* 2006; 176:6464-72.
- Brackenbury W.J., Djamgoz M.B. "Activity-dependent regulation of voltage-gated Na<sup>+</sup> channel expression in Mat-LyLu rat prostate cancer cell line." *J Physiol* 2006; 573:343-56.
- Brackenbury W.J., Chioni A.M., Diss J.K., Djamgoz M.B. "The neonatal splice variant of Nav1.5 potentiates in vitro invasive behaviour of MDA-MB-231 human breast cancer cells." *Breast Cancer Res Treat* 2007;101:149-60.
- Brackenbury W.J., Davis T.H., Chen C., Slat E.A., Detrow M.J., Dickendesher T.L. "Voltage-gated Na<sup>+</sup> channel beta1 subunit-mediated neurite outgrowth requires Fyn kinase and contributes to postnatal CNS development in vivo." *J Neurosci* 2008a;28:3246-56.
- Brysch W., Creutzfeldt O.D., Luno K., Schlingensiepen R., Schlingensiepen K.H. "Regional and temporal expression of sodium channel messenger RNAs in the rat brain during development". *Exp Brain Res* 86: 562-567, 1991
- Burgess D.L., Khorman D.C., Galt J., Plummer N.W., Jones J.M., Spear B., Meisler M.H. "Mutation of a new sodium channel gene, Scn8a, in the mouse mutant motor endplate disease" *NatGen* 1995; 10: 461-465
- Bushati N., Cohen S.M. "microRNA Functions." *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; 23:175-205.
- Callenbach P., De Coo R.F.M., Vein A.A., Arts W.F.M., Oosterwijk J.C., Hageman G., ten Houten R., Terwindt G.M., Lindhout D., Frants R.R., Brouwer O.F. "Benign familial infantile convulsions: a clinical study of seven Dutch families". *Eur J Paediatr Neurol* 2002; 6: 269-283.
- Caraballo R., Pavsek S., Lemainque A., Gastaldi M., Echenne B., Motte J., Genton P., Cersosimo R., Humbertclaude V., Fejerman N., Monaco A.P., Lathrop M.G., Rochette J., Szepietowski P. "Linkage of benign familial infantile convulsions to chromosome 16p12-q12 suggests allelism to the infantile convulsions and choreoathetosis syndrome". *Am J Hum Genet* 2001; 68: 788-794.



Carr D.B., Day M., Cantrell A.R., Held J., Scheuer T., Catterall W.A. "Transmitter modulation of slow, activity-dependent alterations in sodium channel availability endows neurons with a novel form of cellular plasticity". *Neuron* 2003; 39:793–806.

Cantrell A.R., Ma J.Y., Scheuer T., Catterall W. A. "Muscarinic modulation of sodium current by activation of protein kinase C in rat hippocampal neurons." *Neuron* 1996; 16: 1019-1025

Catterall WA, Schmidt JW, Messner DJ, Feller DJ. "Structure and biosynthesis of neuronal sodium channels". *Ann N Y Acad Sci* 1986; 479:186-203.

Cantrell A.R., Catterall W.A. "Neuromodulation of Na<sup>+</sup> channels: an unexpected form of cellular plasticity" *Nat. Rev. Neurosci.* 2001; 2: 397-407

Catterall W.A. "From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels". *Neuron* 2000a; 26:13-25.

Catterall W.A. "Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels". *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000b; 16:521-555

Catterall W.A. "A 3D view of sodium channels" *Nature* 2001; 409: 988-990

Cestele S., Scalmani P., Rusconi R., Terragni B., Franceschetti S., Mantegazza M. "Self-limited hyperexcitability: functional effect of a familial hemiplegic migraine mutation of the Nav1.1 (SCN1A) Na<sup>+</sup> channel". *J Neurosci* 2008; 28: 7273–83.

Chaib H., Rubin M.A., Mucci N.R., Li L., Taylor J.M.G., Day M.L. "Activated in prostate cancer: a PDZ domain-containing protein highly expressed in human primary prostate tumors". *Cancer Res* 2001; 61:2390–4

Chen L.Q., Santarelli V., Horn R., Kallen R.G. "A unique role for the S4 segment of domain 4 in the activation of sodium channels" *J Gen Physiol.* 1996; 108: 549-556

Chen YH, Dale TJ, Romanos MA, Whitaker WR, Xie XM, Clare JJ (2000) Cloning, distribution and functional analysis of the type III sodium channel from human brain. *Eur J Neurosci* 12:4281-4289.

Chen C., Bharucha V., Chen Y., Westenbroek R.E., Brown A., Malhotra D.J., Jones D., Avery C., Gillespie P.J., Kazen-Gillespie K.A., Kazarinova-Noyes K., Shrager P., Saunders T.L., Macdonald R.L., Ransom B.R., Scheuer T., Catterall W.A., Isom L.L. "Reduced sodium channel density, altered voltage dependence of inactivation, and increased susceptibility to seizures in mice lacking sodium channel  $\beta$ 2-subunits" *PNAS* 2002, 99: 17072-17077

Chen C., Westenbroek R.E., Xu X., Edwards C.A., Sorenson D.R., Chen Y., McEwen D.P., O'Malley H.A., Bharucha V., Meadows L.S., Knudsen G.A., Vilaythong A., Noebels J.L., Saunders T.L., Scheuer T., Shrager P., Catterall W.A., Isom L.L. "Mice lacking sodium channel  $\beta$ 1 subunit display defects in neuronal excitability, sodium channel expression, and nodal architecture" *J Neurosci* 2004; 24(16): 4030-4042

Chen Y., Yu F.H., Surmeier D.J., Scheuer T., Catterall W.A. "Neuromodulation of Na<sup>+</sup> channel slow inactivation via cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C". *Neuron* 2006 ; 49:409–20.

Christianson J.C., Green W.N. "Regulation of nicotinic receptor expression by the ubiquitin–proteasome system". *EMBO J* 2004;23:4156–65.

Claes L., Del Favero J., Ceulemans B., Lagae L., Van Broeckhoven C., De Jonghe P. “De novo mutations in the sodium-channel gene *SCN1A* cause severe myoclonic epilepsy of infancy”. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 1327–32.

Davis J., Lambert S., Bennett V. “Molecular composition of the node of Ranvier: identification of ankyrin-binding cell adhesion molecules neurofascin (mucin+/third FNIII domain-) and NrCAM at nodal axon segments” *J Cell Biol* 1996; 135: 1355-1367

Deguchi M., Iizuka T., Hata Y., Nishimura W., Hirao K., Yao I. “PAPIN. A novel multiple PSD-95/Dlg-A/ZO-1 protein interacting with neural plakophilin-related armadillo repeat protein/delta-catenin and p0071”. *J Biol Chem* 2000; 275:29875–80.

De Matteis M.A., Morrow J.S. “Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic pathway”. *J Cell Sci* 2000; 113(Pt 13):2331–43

Depienne C., Trouillard O., Saint-Martin C., Gourfinkel-An I., Bouteiller D., Carpentier W., Keren B., Abert B., Gautier A., Baulac S., Arzimanoglou A., Cazeneuve C., Nabbout R., LeGuern E. “Spectrum of *SCN1A* gene mutations associated with Dravet syndrome: analysis of 333 patients”. *J Med Genet* 2009; 46(3):183-191.

Deschenes I., Neyroud N., DiSilvestre D., Marban E., Yue D.T., Tomaselli G.F. „Isoform-specific modulation of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels by calmodulin” *Circ Res* 2002; 90: e49-e57

Dichgans M., Freilinger T., Eckstein G., Babini E., Lorenz-Depiereux B., Biskup S., Ferrari D.M., Herzog J., van De Maagdenberg A., Pusch M., Strom T.M. “Mutation in the neuronal voltage-gated sodium channel *SCN1A* in familial hemiplegic migraine” *The Lancet* 2005; 366: 371-377

Ding Y., Brackenbury W.J., Onganer P.U., Montano X., Porter L.M., Bates L.F.. “Epidermal growth factor upregulates motility of Mat-LyLu rat prostate cancer cells partially via voltage-gated Na<sup>+</sup> channel activity.” *J Cell Physiol* 2008;215:77–81.

Donier E., Rugiero F., Okuse K., Wood J.N. „Annexin II light chain p11 promotes functional expression of acid-sensing ion channel ASIC1a”. *J Biol Chem* 2005; 280:38666–72.

Dowling P., Meleady P., Dowd A., Henry M., Glynn S., Clynes M. “Proteomic analysis of isolated membrane fractions from superinvasive cancer cells”. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1774:93–101

Dravet C., Bureau M., Oguni H., Fukuyama Y., Cokar O. “Severe myoclonic epilepsy in infancy: Dravet syndrome”. *Adv Neurol* 2005; 95: 71–102

Fahmi A.I., Forhead A.J., Fowden A.L., Vandenberg J.I. “Cortisol influences the ontogeny of both alpha- and beta-subunits of the cardiac sodium channel in fetal sheep.” *J Endocrinol* 2004; 180:449–55.

Foulkes T., Nassar M.A., Lane T., Matthews E.A., Baker M.D., Gerke V-“Deletion of annexin 2 light chain p11 in nociceptors causes deficits in somatosensory coding and pain behaviour”. *J Neurosci* 2006; 26:10499–507.

Fotia A.B., Ekberg J., Adams D.J., Cook D.I., Poronnik P., Kumar S. “Regulation of neuronal voltage-gated sodium channels by the ubiquitin-protein ligases Nedd4 and Nedd4.2”. *The J Biol Chem* 2004; 279: 28930-28935

Fozzard H.A. and Hanck D.A. “Structure and function of voltage-dependent sodium channels: comparison of brain II and cardiac isoforms”. *Physiol Rev* 1996; 76(3):887-926.

- Fujiwara T., Watanabe M., Takahashi Y., Higashi T., Yagi K., Seino M. "Long-term course of childhood epilepsy with intractable grand mal seizures". *Jpn J Psych Neurol* 1992; 46(2):297-302
- Fujiwara T., Sugawara T., Mazaki Miyazaki E., Takahashi Y., Fukushima K., Watanabe M., Hara K., Morikawa T., Yagi K., Yamakawa K., Inoue Y. "Mutations of sodium channel alpha subunit type 1 (SCN1A) in intractable childhood epilepsies with frequent generalized tonic-clonic seizures". *Brain* 2003;126:513-514
- Gargus J.J. and Tournary A. "Novel mutation confirms seizure locus SCN1A is also familial hemiplegic migraine locus FHM3". *Pediatr Neurol* 2007; 37(6):407-10
- Garrido J.J., Giraud P., Carlier E., Fernandes F., Moussif A., Fache M.P., Debanne D., Dargent B. "A targeting motif involved in sodium channel clustering at the axonal initial segment" *Science* 2003; 300:2091-94
- Gatto C.L., Walker B.J., Lambert S. "Local ERM activation and dynamic growth cones at Schwann cell tips implicated in efficient formation of nodes of Ranvier". *J Cell Biol* 2003; 162:489-98.
- George A.L. "Inherited disorders of voltage-gated sodium channels" *J Clinl Invest* 2005; 115: 1990-1999
- Giannelli G., Milillo L., Marinosci F., Lo Muzio L., Serpico R., Antonaci S. "Altered expression of integrins and basement membrane proteins in malignant and pre-malignant lesions of oral mucosa". *J Biol Reg Homeos Ag* 2001; 15:375-80.
- Girard C., Tinel N., Terrenoire C., Romey G., Lazdunski M., Borsotto M. "p11, an annexin II subunit, an auxiliary protein associated with the background K<sup>+</sup> channel, TASK-1". *EMBO J* 2002; 21:4439-48.
- Goldfarb M., Schoorlemmer J., Williams A., Diwakar S., Wang Q., Huang X., Giza J., Tchetchik D., Kelley K., Vega A., Matthews G., Rossi P., Ornitz D.M., D'Angelo E. "Fibroblast growth factor homologous factors control neuronal excitability through modulation of voltage-gated sodium channels" *Neuron* 2007; 55: 4sm-463
- Goldin A.L., Barchi R.L., Caldwell J.H., Hofmann F., Howe J.R., Hunter J.C., Kallen R.G., Mandel G., Meisler M.H., Netter Y.B. "Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000, 28: 365-368".
- Goldin A.L. "Evolution of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels". *J Exp Biol* 2002, 205: 575-584
- Gong B., Rhodes K.J., Bekele-Arcuri Z., Trimmer J.S. "Type I and type II Na<sup>+</sup> channel  $\alpha$  subunit polypeptides exhibit distinct spatial and temporal patterning, and association with auxiliary subunits in rat brain" *J Comp Neurol* 1999; 412: 342-352
- Grieco T.M., Malhotra D.J., Chen C., Isom L.L., Raman I.M. "Open-channel block by the cytoplasmic tail of sodium channel  $\beta$ 4 as a mechanism for resurgent current" *Neuron* 2005, 45: 233-244
- Grosso S., Orrico A., Galli L., Di Bartolo R., Sorrentino V., Balestri P. "SCN1A mutation associated with Panayiotopoulos syndrome". *Neurol* 2007; 69(6):609-611
- Guy H.R., Seetharamulu P. "Molecular model of the action potential sodium channel". *Proc Nat Acad Sci USA* 1986; 508: 508-512

- Gursoy-Ozdemir Y., Qiu J., Matsuoka N., Bolay H., Bempohl D., Jin H., and others "Cortical spreading depression activates and upregulates MMP-9" *J Clin Invest* 2004; 113(10): 1447-55
- Haenggi T., Fritschy J.M. "Role of dystrophin and utrophin for assembly and function of the dystrophin glycoprotein complex in non-muscle tissue". *Cell Mol Life Sci* 2006; 63:1614-31.
- Harkin L.A., Bowser D.N., Dibbens L.M., Singh R., Phillips F., Wallace R.H., Richards M.C., Williams D.A., Mulley J.C., Berkovic S.F., Scheffer I.E. "Truncation of the GABA A receptor  $\gamma 2$  subunit in a family with generalized epilepsy with febrile seizures plus" *Am J Hum Gen.* 2002; 70: 530-536
- Harkin LA, McMahon JM, Iona X, et al. The spectrum of *SCN1A*-related infantile epileptic encephalopathies. *Brain* 2007; 130: 843-52.
- Hayes M.J., Merrifield C.J., Shao D., Ayala-Sanmartin J., Schorey C.D., Levine T.P. "Annexin 2 binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on endocytic vesicles is regulated by the stress response pathway". *J Biol Chem* 2004a; 279:14157-64.
- Hayes M.J., Rescher U., Gerke V., Moss S.E. "Annexin-actin interactions". *Traffic* 2004b; 5:571-6.
- Heinemann S.H., Terlau H., Stuhmer W., Imoto K., Numa S. "Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single point mutations" *Nature* 1992b; 356: 441-443
- Helbig I., Scheffer I.E., Mulley J.C., Berkovic F.S. "Navigating the channels and beyond: unravelling the genetics of the epilepsies". *Lancet Neurol* 2008; 7 (3): 231-245.
- Herlitze S., Garcia D.E., Mackie K., Hille B., Scheuer T., Catterall W.A. "Molecular determinants of inactivation and G protein modulation in the intracellular loop connecting domains I and II of the calcium channel  $\alpha_{1A}$  subunit" *PNAS* 1997; 94: 1512-1516
- Heron S.E., Crossland K.M., Andreemann E., Phillips H.A., Hall A.J., Bleasel A., Shevell M., Mercho S., Seni M.H., Guiot M.C., Mulley J.C., Berkovic S.F., Scheffer I.E. "Sodium-channel defects in benign familial neonatal-infantile seizures" *Lancet* 2002; 360: 851-852
- Herzog R.I., Liu C., Waxman S.G., Cummins T.R. "Calmodulin Binds to the C Terminus of Sodium Channels  $Na_v1.4$  and  $Na_v1.6$  and Differentially Modulates Their Functional Properties" *J Neurosci* 2003, 23(23):8261- 8270
- Hilborn M.D., Vaillancourt R.R., Rane S.G. "Growth factor receptor tyrosine kinases acutely regulate neuronal sodium channels through the src signalling pathway" *J Neurosci* 1998; 18: 590-600
- Hille B. Ionic channels of excitable membranes. *Sunderland: Sinauer Associates Inc*, 2001.
- Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol*, 1952a; 17:500-544.
- Holland K.D., Kearney J.A., Glauser T.A. "Mutation of sodium channel SCN3A in a patient with cryptogenic pediatric partial epilepsy." *Neurosci Lett* 2008; 433: 65-70.
- Horne E.A., Dell'Acqua M.L. "Phospholipase C is required for changes in postsynaptic structure and function associated with NMDA receptor-dependent long-term depression". *J Neurosci* 2007; 27:3523-34.

- Huang C.L., Slesinger P.A., Casey P.J., Jan Y.N., Jan L.Y. "Evidence that direct binding of G $\beta\gamma$  to the GIRK1 G protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel is important for channel activation" *Neuron* 1995; 15: 1133-1143
- Huth T., Schmidt-Neuenfeldt K., Rittger A., Saftig P., Reiss K., Alzheimer C. "Non-proteolytic effect of beta-site APP-cleaving enzyme 1 (BACE1) on sodium channel function". *Neurobiol Dis* 2009; 33:282–289.
- Ikeda S.R. "Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein  $\beta\gamma$  subunits" *Nature* 1996; 380: 255-258
- Isom L.L., De Jongh K.S., Patton D.E., Reber B.F.X., Offord J., Charbonneau H., Walsh K., Goldin A.L., Catterall W.A. "Primary structure and functional expression of the  $\beta$ 1 subunit of the rat brain sodium channel" *Science* 1992, 256, 839-842
- Isom L.L., Ragsdale D.S., De Jongh K.S., Westenbroek R.E., Reber B.F.X., Scheuer T., Catterall W.A. "Structure and function of the  $\beta$ 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM-motif" *Cell* 1995a, 83, 433-442
- Isom L.L., Scheuer T., Brownstein A.B., Ragsdale D.S., Murphy B.J., Catterall W.A. "Functional co-expression of the  $\beta$ 1 and type IIA  $\alpha$  subunits of sodium channels in a mammalian cell line" *J Biol Chem* 1995b, 270, 3306-3312
- Isom L.L. "Sodium channel  $\beta$  subunits: anything but auxiliary" *The Neuroscientist* 2001; 7: 42-54
- Isom L.L. "The role of sodium channels in cell adhesion". *Front Biosci* 2002; 7:12–23.
- Jenkins S.M., Bennett V. "Ankyrin-G coordinates assembly of the spectrin-based membrane skeleton, voltage-gated sodium channels, and L1 CAMs at Purkinje neuron initial segments." *J Cell Biol* 2001;155:739–46.
- Jespersen T., Gavillet B., van Bemmelen M.X., Cordonier S., Thomas M.A., Staub O. "Cardiac sodium channel Nav1.5 interacts with and is regulated by the protein tyrosine phosphatase PTPH1." *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 348:1455–62.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B., and MacKinnon, R. "X-ray structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel". *Nature* 2003a; 423: 33–41.
- Jiang Y., Ruta V., Chen J., Lee A., and MacKinnon R. "The principle of gating charge movement in a voltage dependent K<sup>+</sup> channel in a lipid bilayer". *Science* 2003b; 306: 491-495.
- Johnson D., Bennet E.S. "Isoform-specific effects of the  $\beta$ 2 subunit on voltage-gated sodium channel gating" *J Biol Chem* 2006; 281: 25875-25881
- Kamiya K., Kaneda M., Suguwara T., Mazaki E., Okamura N., Montal M., Makita N., Tanaka M., Fukushima K., Fujiwara T., Inoue Y., Yamakawa K. "A nonsense mutation of the sodium channel gene SCN2A in a patient with intractable epilepsy and mental decline" *J Neurosci* 2004; 24(11): 2690-2698
- Kanai K., Hirose S., Oguni H., Fukuma G., Shirasaka Y., Miyajima T., Wada K., Iwasa H., Yasumoto S., Matsuo M., Ito M., Mitsudome A., Kaneko S. "Effect of localization of missense mutation in SCN1A on epilepsy phenotype severity" *Neurology* 2004; 63:329-334
- Kaplan R.E., Lacey D.J. "Benign familial neonatal-infantile seizures". *Am J Med Genet* 1983; 16: 595–599.

- Kass R.S. "The channelopathies: novel insights into molecular and genetic mechanisms of human disease" *J Clin Invest* 2005; 115: 1986-1989
- Kazen-Gillespie K.A., Ragsdale D.S., D'Andrea M.R., Mattei L.N., Rogers K.E., Isom L.L. "Cloning, localization and functional expression of sodium channel  $\beta 1_A$  subunits" *J Biol Chem* 2000, 275, 1079-1088
- Kearney J.A., Plummer N.W., Smith M.R. "A gain-of-function mutation in the sodium channel gene *Scn2a* results in seizures and behavioral abnormalities". *Neurosci* 2001; **102**: 307-17.
- Ketelaars S.O., Gorter J.A., van Vliet E.A., Lopes da Silva F.H., Wadman W.J. "Sodium currents in isolated rat CA1 pyramidal and dentate granule neurones in the post-status epilepticus model of epilepsy". *Neurosci* 2001; **105**: 109-20.
- Kim D.Y., MacKenzie Ingano L.A., Carey B.W., Pettingel W.H., Kovacs D.M. "Presenilin/ $\gamma$ -secretase-mediated cleavage of the voltage-gated sodium channel  $\beta 2$ -subunit regulates cell adhesion and migration" *J of Biol Chem* 2005; 280: 23251-23261
- Kim D.Y., Carey B.W., Wang H., Ingano L.A.M., Binshtok A.M., Wertz M.H., Pettingell W.H., He P., Lee V.M.Y., Woolf C.J., Kovacs D.M. "BACE1 regulates voltage-gated sodium channels and neuronal activity" *Nature Cell Biology* 2007; 9: 755-764
- Klein J.P., Khera D.S., Nersesyan H., Kimchi E.Y., Waxman S.G., Blumenfeld H. "Dysregulation of sodium channel expression in cortical neurons in a rodent model of absence epilepsy". *Brain Res* 2004; 1000: 102-09.
- Kors E.E., Vanmolkot K.R., Haan J., Frants R.R., van den Maagdenberg A, Ferrari M.D. "Recent findings in headache genetics" *Curr Opin Neurol* 2004; 17(3): 283-8
- Kosaka T., Komada M., Kosaka K. "Sodium channel cluster, betaIV-spectrin and ankyrinG positive "hot spots" on dendritic segments of parvalbumin-containing neurons and some other neurons in the mouse and rat main olfactory bulbs". *Neurosci Res* 2008; 62:176-86.
- Kovacs D.M., Gersbacher M. T., Yeon Kim D. "Alzheimer's secretases regulate voltage-gated sodium channels". *Neurosci lett* 2010; 10.1016/j.neulet.2010.08.048
- Krafte D.S., Goldin A.L., Auld V.J., Dunn R.J., Davidson N., Lester H.A. "Inactivation of cloned sodium channels expressed in *Xenopus* oocytes" *J. Gen. Physiol.* 1990., 96, 689-706
- Krzemien D.M., Schaller K.L., Levinson S.R., Caldwell J.H. "Immunolocalization of sodium channel isoform NaCh6 in the nervous system". *J Comp Neurol* 2000; 420: 70-83
- Kullmann D.M. "Neurological channelopathies" . *Annu Rev Neurosci* 2010; 33: 151-172.
- Kumar S., Harvey K.F., Kinoshita M., Copeland N.G., Noda M., Jenkins N.A. "cDNA cloning, expression analysis, and mapping of the mouse *Nedd4* gene". *Genomics* 1997; 40:435-43.
- Kunkel M.T., Peralta E.G. "Identifications of domains conferring G protein regulation on inward rectifier potassium channels" *Cell* 1995; 83: 443-449
- Laezza F., Gerber B.R., Lou J., Kozel M.A., Hartman H., Craig A.M., Ornitz D.M., Nerbonne J.M. "The *Fgf14*(F145S) mutation disrupts the interaction of FGF14 with voltage-gated Na<sup>+</sup> channels and impairs neuronal excitability". *J Neurosci* 2007; 27: 12033-12044
- Lai H.C., Jan L.Y. "The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels" *Nature Rev* 2006; 7: 548-562

- Lee-Kwon W., Goo J.H., Zhang Z., Silldorff E.P., Pallone T.L. "Vasa recta voltage-gated Na<sup>+</sup> channel Nav1.3 is regulated by calmodulin". *Am J Physiol* 2007; 292:F404–14.
- Lemaitre G., Walker B., Lambert S. "Identification of a conserved ankyrin-binding motif in the family of sodium channel  $\alpha$  subunits". *J Biol Chem* 2003; 278:27333–9.
- Lewis T.B., Shevell M.I., Andermann E., Ryan S.G., Leach R.J. "Evidence of a third locus for benign familial convulsions". *J Child Neurol*. 1996; 11: 211-214
- Li M., West J.W., Lai Y., Scheuer T., Catterall W.A. "Functional modulation of brain sodium channels by cAMP-dependent phosphorylation". *Neuron* 1992, 8, 1151-1159
- Liu C., Dib-Hajj S.D., Waxman S.G. "Fibroblast growth factor homologous factor 1B binds to the C terminus of the tetrodotoxin-resistant sodium channel rNav1.9a (NaN)". *J Biol Chem* 2001; 276: 18925–18933.
- Liu Y, Jurman ME, Yellen G (1996) Dynamic rearrangement of the outer mouth of a K<sup>+</sup> channel during gating. *Neuron* 16:859-867.
- Livingston J.H., Cross J.H., Mclellan A., Birch R., Zuberi S.M. "A novel inherited mutation in the voltage sensor region of SCN1A is associated with Panayiotopoulos syndrome in siblings and generalized epilepsy with febrile seizures plus". *J Child Neurol* 2009; 24(4):503-508
- Lossin C., Wang D.W., Rhodes T.H., Vanoye C.G., George A.L. "Molecular basis for an inherited epilepsy". *Neuron* 2002; 34: 877-884
- Lossin C. "A catalog of SCN1A variants". *Brain Develop* 2009; 31:114–130
- Lopez-Santiago L.F., Pertin M., Morisod X., Chen C., Hong S., Wiley J., Decosterd I., Isom L.L. "Sodium channel  $\beta$ 2 subunits regulate tetrodotoxin-sensitive sodium channels in small dorsal root ganglion neurons and modulate the response to pain". *J Neurosci* 2006; 26(30): 7984-7994
- Lorincz A. and Nusser Z. "Cell-Type-Dependent Molecular Composition of the Axon Initial Segment". *J Neurosci* 2008; 28(53):14329–14340
- Lotan I., Dascal N., Naor Z., Botton R. "Modulation of vertebrate brain Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> channels by subtypes of protein kinase C". *FEBS Lett*. 1990; 267: 25-28
- Lou J.Y., Laezza F., Gerber B.R., Xiao M., Yamada K.A., Hartmann H., Carig H., Nerbonne J.M., Ornitz D.M. "Fibroblast growth factor 14 is an intracellular modulator of voltage-gated sodium channels". *J Physiol*. 2005; 569: 179-193
- Louvet-Vallee S. "ERM proteins: from cellular architecture to cell signalling". *Biol Cell* 2000; 92:305–16
- Lustig M., Zanazzi G., Sakurai T., Blanco C., Levinson S.R., Lambert S., Grumet M., Salzer J.L. "Nr-CAM and neurofascin interactions regulate ankyrin G sodium channel clustering at the node of Ranvier". *Curr Biol* 2001; 11: 1864-1869
- Macdonald R.L., Kang J.Q. "Molecular pathology of genetic epilepsies associated with GABA(A) receptor subunit mutations". *Epilepsia Curr* 2009; 9:18—23.
- Malhotra J.D., Kazen-Gillespie K., Hortsch M., Isom L.L. "Sodium channel  $\beta$  subunits mediate homophilic cell adhesion and recruits ankyrin to points of cell-cell contact". *J Biol Chem* 2000; 275, 11383-11388

- Mantegazza M., Yu F.H., Catterall W.A., Scheuer T. "Role of the C-terminal domain in inactivation of brain and cardiac sodium channels". *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 15348–53.
- Mantegazza M., Yu F.H., Powell A.J., Clare J.J., Catterall W.A., Scheuer T. "Molecular determinants for modulation of persistent sodium current by G-protein  $\beta\gamma$  subunits" *J Neurosci* 2005; 25 (13): 3341-9
- Mantegazza M., Gambardella A., Rusconi R., Schiavon E., Annesi F., Restano Cassulini R., Labate A., Carriedo S., Chifari R., Canevini M.P., Canger R., Franceschetti S., Annesi G., Wanke E., Quattrone A. "Identification of an  $\text{Na}_v1.1$  sodium channel (SCN1A) loss-of-function mutation associated with familial simple febrile seizures" *PNAS* 2005; 102: 18177-18182
- Mantegazza M., Curia G., Biagini G., Ragsdale D.S., Avoli M. "Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets in epilepsy and other neurological disorders" *Lancet*, 2010; 9, 413-424
- Maltsev V.A., Reznikov V., Undrovinas N.A., Sabbah H.N., Undrovinas A. "Modulation of late sodium current by  $\text{Ca}^{2+}$ , calmodulin, and CaMKII in normal and failing dog cardiomyocytes: similarities and differences". *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294:H1597–608.
- Marini C. and Mantegazza M. "Na<sup>+</sup> channel and epilepsy: recent avances and new perspectives". *Expert Rev Clin Pharmacol* 2010; 3(3).
- McCormick K.A., Isom L.L., Ragsdale D., Smith D., Scheuer T., Catterall W.A. "Molecular determinants of Na<sup>+</sup> channel function in the extracellular domain of the  $\beta 1$  subunit" *J Biol Chem* 1998, 273, 3954-3962
- McEwen D.P., Isom L.L. "Heterophilic interactions of sodium channel  $\beta 1$  subunits with axonal and glial cell adhesion molecules" *J Biol Chem* 2004; 279: 52744-52752
- McEwen D.P., Meadows L.S., Chen C., Thyagarajan V., Isom L.L. "Sodium channel  $\beta 1$  subunit-mediated modulation of  $\text{Nav}1.2$  currents and cell surface density is dependent on interactions with contactin and ankyrin" *J Biol Chem* 2004; 279: 16044-16049
- Meadows L., Malhotra J.D., Stetzer A., Isom L.L., Ragsdale D.S. "The intracellular segment of the sodium channel  $\beta_1$  subunit is required for its efficient association with the channel  $\alpha$  subunit" *J Neurochem* 2001; 76:, 1871-1878
- Meadows L.S., Chen H.Y., Powell A.J., Clare J.J., Ragsdale D.S. "Functional modulation of human brain  $\text{Na}_v1.3$  sodium channels, expressed in mammalian cells, by auxiliary  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  subunits" *Neurosci* 2002; 114: 745-753
- Medeiros-Domingo A., Kaku T., Tester D.J., Iturralde-Torres P., Itty A., Ye B., Valdivia C., Ueda K., Canizales-Quinteros S., Tusiè-Luna M.T., Makielsky J.C., Ackerman M.J. "SCN4B-encoded sodium channel  $\beta 4$  subunit in congenital Long-QT syndrome" *Circ* 2007; 116: 134-142
- Meisler M.H., Kearney J.A. "Sodium channel mutations in epilepsy and other neurological disorders" *J Clin Invest* 2005; 115: 2010-2017
- Mitrovic N., Gorge A.L.Jr., Horn R. "Role of domain 4 in sodium channel slow inactivation" *J Gen Physiol* 2000; 115: 707-717
- Miyazaki H., Oyama F., Wong H.K., Kaneko K., Sakurai T., Tamaoka A., Nukina N. "BACE1 modulates filopodia-like protrusions induced by sodium channel  $\beta 4$  subunit" *BBRC* 2007; 361: 43-48



- Moorman J.R., Kirsch G.E., Van Dongen A.M., Joho R.H., Brown A.M. "Fast and slow gating of sodium channels encoded by a single mRNA", *Neuron* 1990; 4: 243-252
- Morgan I., Stevens E., Shah B., Cox P.J. Dixon A.K., Lee K., Pinnock R.D., Hughes J., Richardson P.J., Mizuguchi K., Jackson A.P. "Beta-3: an additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics" *PNAS* 2000; 97: 2308-2313
- Morimoto M., Mazaki E., Nishimura A., Chiyonobu T., Sawai Y., Murakami A., Nakamura K., Inoue I., Ogiwara I., Sugimoto T., Yamakawa K. "SCN1A mutation mosaicism in a family with severe myoclonic epilepsy in infancy". *Epilepsia* 2006; 47:1732–1736.
- Mohler P.J., Gramolini A.O., Bennett V. "Ankyrins". *J Cell Sci* 2002; 115:1565–6.
- Mohler P.J., Rivolta I., Napolitano C., LeMaillet G., Lambert S., Priori S.G. "Nav1.5 E1053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Nav1.5 on the surface of cardiomyocytes". *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:17533–8
- Mori M., Konno T., Morii T., Nagayama K., Imoto K. "Regulatory interaction of sodium channel IQ-motif with calmodulin C-terminal lobe". *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 307:290–6
- Mulley J.C., Scheffer I.E., Petrou S., Dibbens L.M., Berkovic S.F. "Harkin LA. *SCN1A* mutations and epilepsy". *Hum Mutat* 2005; 25: 535–42
- Murphy B.J., Rossie S., De Jongh K.S., Catterall W.A. "Identification of the sites of selective phosphorylation and dephosphorylation of the rat brain Na<sup>+</sup> channel  $\alpha$  subunit by cAMP-dependent protein kinase and phosphoprotein phosphatases" *J Biol Chem* 1993, 268, 27355-27362
- Miyazaki H., Oyama F., Wong H.K., Kaneko K., Sakurai T., Tamaoka A., Nukina N. "BACE1 modulates filopodia-like protrusions induced by sodium channel beta4 subunit" *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 361:43–48.
- Nandi D., Tahiliani P., Kumar A., Chandu D. "The ubiquitin–proteasome system". *J Biosci* 2006; 31:137–55.
- Nakayama J. and Arinami T. "Molecular genetics of febrile seizures". *Epilepsy Res* 2006; 70: 190–198
- Nakayama J., Arinami T. "Molecular genetic of febrile seizures" *Epilepsy Res* 2006; 70S:S190-198
- Noda M., Shimizu S., Tanabe T., Takai T., Kayano T., Ikeda T., Takahashi H., Nakayama H., Kanaoka Y., Minamino N. "Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence". *Nature* 1984; 312:121–127
- Naren A.P., Cobb B., Li C., Roy K., Nelson D., Heda G.D. "A macromolecular complex of beta 2 adrenergic receptor, CFTR, and ezrin/radixin/moesin-binding phosphoprotein 50 is regulated by PKA". *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:342–6.
- Numann R., Catterall W.A., Scheuer T. "Functional modulation of brain sodium channels by protein kinase C phosphorylation" *Science* 1991; 254: 115-118
- Ogiwara I., Miyamoto H., Morita N., Atapour N., Mazaki E., Inoue I., Takeuchi T., Itohara S., Yanagawa Y., Obata K., Furuichi T., Hensch T.K., Yamakawa K. "Na<sub>v</sub>1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for

epileptic seizures in mice carrying an Scn1a gene mutation" *J Neurosci* 2007; 27(22): 5903-5914

Okuse K., Chaplan S.R., McMahon S.B., Luo Z.D., Calcutt N.A., Scott B.P. "Regulation of expression of the sensory neuron-specific sodium channel SNS in inflammatory and neuropathic pain." *Mol Cell Neurosci* 1997;10:196-207

Okuse K., Malik-Hall M., Baker M.D., Poon W.Y., Kong H., Chao M.V. "Annexin II light chain regulates sensory neuron-specific sodium channel expression". *Nature* 2002; 417:653-6.

O'Reilly J.P., Wang S.Y., Wang G.K. "Residue-specific effects on slow inactivation at V787 in D2-S6 of Na<sub>v</sub>1.4 sodium channels" *Biophys J* 2001; 81: 2100-2111

Oyama F, Miyazaki H., Sakamoto N., Becquet C., Machida Y., Kaneko K., Uchikawa C., Suzuki T., Kurosawa M., Ikeda T., Tamaoka A., Sakurai T., Nukina N. "Sodium channel  $\beta$ 4 subunit: down-regulation and possible involvement in neuritic degeneration in Huntington's disease transgenic mouse" *J Neurochem* 2006; 98: 518-529

Parson A.A. "Cortical spreading depression: its role in migraine pathogenesis and possible therapeutic intervention strategies" *Curr Pain Headache Rep.* 2004; 8(5): 410-416

Patino G.A., Claes L.R., Lopez-Santiago L.F., et al. "A functional null mutation of SCN1B in a patient with Dravet syndrome". *J Neurosci* 2009; 29: 10764-78.

Patton D.E., Isom L.L., Catterall W.A., Goldin A.L. "The adult rat brain beta 1 subunit modifies activation and inactivation gating of multiple sodium channel alpha subunits", *J Biol Chem* 1994; 269: 17649-17655

Peles E., Salzer J.L. "Molecular domains of myelinated axons". *Curr Opin Neurobiol* 2000; 10: 558-565.

Pietrobon D., Striessnig J. "Neurobiology of migraine" *Nat Rev Neurosci* 2003; 4(5): 386-398

Pietrobon D. "Migraine: new molecular mechanisms" *The Neuroscientist* 2005; 4:373-386

Plummer N.W., Meisler M.H. "Evolution and diversity of mammalian sodium channel genes". *Genomics* 1999, 57: 323-331.

Poelzing S., Forleo C., Samodell M., Dudash L., Sorrentino S., Anaclerio M., Troccoli R., Iacoviello M., Romito R., Guida P., Chahine M., Pitzalis M., Deschênes I. "SCN5A Polymorphism Restores Trafficking of a Brugada Syndrome Mutation on a Separate Gene". *Circ* 2006; 114:368-376.

Poliak S., Peles E. "The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier". *Nat Rev Neurosci* 2003; 4: 968-980.

Qin N., D'Andrea M.R., Lubin M.L., Shafee N., Codd E.E., Correa A.M. "Molecular cloning and functional expression of the human sodium channel  $\beta$ 1<sub>B</sub> subunit, a novel splice variant of the  $\beta$ 1 subunit" *Eur J Biochem* 2003; 270: 4762-4770

Qu Y., Rogers J.C., Chen S.F., McCormick K.A., Scheuer T., Catterall W.A. "Functional roles of the extracellular segments of the sodium channel  $\alpha$  subunit in voltage-dependent gating and modulation by  $\beta$ 1 subunits" *J Biol Chem* 1999; 274: 32647-32654

Qu Y., Curtis R., Lawson D., Gilbride K., Ge P., DiStefano P.S., Silos-Santiago I., Catterall W.A. "Differential modulation of sodium channel gating and persistent sodium currents by the  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 and  $\beta$ 3 subunits" *Molec Cell Neurosci* 2001; 18: 570-580

- Ragsdale D.S. "How do mutant Nav1.1 sodium channels cause epilepsy?" *Brain Res Rev* 2008; 58: 149–59.
- Raman I.M., Bean B.P. "Resurgent sodium current and action potential formation in dissociated cerebellar Purkinje neurons" *J Neurosci* 1997;17: 4517-4526
- Ratcliffe C.F., Qu Y., McCormick K.A., Tibbs V.C., Dixon J.E., Scheuer T., Catterall W.A. "A sodium channels signalling complex: modulation by associated receptor protein tyrosine phosphatase beta" *Nat Neurosci* 2000; 3: 437-444
- Ratcliffe C.F., Westenbroeck R.E., Curtis R., Catterall W.A. "Sodium channel  $\beta 1$  and  $\beta 3$  subunits associate with neurofascin through their extracellular immunoglobulin-like domain" *J Cell Biol* 2001; 154: 427-434
- Recio-Pinto E., Thornhill W.B., Duch D.S., Levinson S.R., Urban B.W. "Neuroaminidase treatment modifies the function of electroplax sodium channels in planar lipid bilayers" *Neuron* 1990; 5: 675-684
- Reid C.A., Berkovic S.F., Petrou S. "Mechanisms of human inherited epilepsies". *Prog Neurobiol* 2009; 87: 41-57.
- Renigunta V., Yuan H., Zuzarte M., Rinne S., Koch A., Wischmeyer E. "The retention factor p11 confers an endoplasmic reticulum-localization signal to the potassium channel TASK-1." *Traffic* 2006;7:168–81
- Rescher U. and Gerke V. "S100A10/p11: family, friends and functions". *Pflugers Arch* 2008; 455:575–82.
- Rescher U., Ruhe D., Ludwig C., Zobiack N., Gerke V. "Annexin 2 is a phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding protein recruited to actin assembly sites at cellular membranes". *J Cell Sci* 2004; 117:3473–80.
- Richmond J.E., Featherstone D.E., Hartmann H.A., Ruben P.C. "Slow inactivation in human cardiac sodium channels". *Biophys* 1998; 74:2945-2952.
- Rogers J.C., Qu Y., Tanada T.N., Scheuer T., Catterall W.A. "Molecular determinants of high affinity binding of  $\alpha$ -scorpion toxin and sea anemone toxin in the S3-S4 extracellular loop in domain IV of the  $\text{Na}^+$  channel  $\alpha$  subunit" *J Biol Chem* 1996; 271: 15950-15962
- Rush A.M., Wittmack E.K., Tyrrell L., Black J.A., Dib-Hajj S.D., Waxman S.G. "Differential modulation of sodium channel  $\text{Na(v)}1.6$  by two members of the fibroblast growth factor homologous factor 2 subfamily. *Eur J Neurosci* 2006b; 23: 2551–2562.
- Rusconi R., Scalmani P., Restano Cassulini R., Giunti G., Gambardella A., Franceschetti S., Annesi G., Wanke E., Mantegazza M. "Modulatory proteins can rescue a trafficking defective epileptogenic  $\text{Na}_v1.1$   $\text{Na}^+$  channel mutant" *J Neurosci* 2007; 27(41): 11037-11046
- Rusconi R., Combi R., Cestele S., Mantegazza M. "A rescuable folding defective Nav1.1 (SCN1A) sodium channel mutant causes GEFS+: common mechanism in Nav1.1 related epilepsies?" *Hum Mutat* 2009; 30: E747–60.
- Sanchez-del-Rio M., Reuter U., Moskowitz M.A. "New insights into migraine pathophysiology" *Curr opinion neurol* 2006; 19: 294-298
- Sato C., Ueno Y., Asai K., Takahashi K., Sato M., Engel A., Fujiyoshi Y. "The voltage-sensitive sodium channel is a bell shaped molecule with several cavities" *Nature* 2001; 409: 1047-1051

- Scalmani P., Rusconi R., Armatura E., Zara F., Avanzino A., Franceschetti S., Mantegazza M. "Effects in neocortical neurons of mutations of the  $\text{Na}_v1.2$   $\text{Na}^+$  channel causing benign neonatal-infantile seizures" *J Neurosci* 2006; 26(40): 10100-9
- Schade S.D., Brown G.B. "Identifying the promoter region of the human brain sodium channel subtype II gene (SCN2A)." *Brain Res Mol Brain Res* 2000;81:187-90.
- Shah V.N., Wingo T.L., Weiss K.L., Williams C.K., Balser J.R., Chazin W.J. "Calcium-dependent regulation of the voltage-gated sodium channel hH1: intrinsic and extrinsic sensors use a common molecular switch." *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:3592-7.
- Shakkottai V.G., Xiao M., Xu L., Wong M., Nerbonne J.M., Ornitz D.M., Yamada K.A. "FGF14 regulates the intrinsic excitability of cerebellar Purkinje neurons. *Neurobiol Dis* 2009; 33: 81-88.
- Shang L.L., Dudley Jr S.C. "Tandem promoters and developmentally regulated 5' - and 3' -mRNA untranslated regions of the mouse SCN5A cardiac sodium channel." *J Biol Chem* 2005; 280:933-40.
- Shearwin-Whyatt L., Dalton H.E., Foot N., Kumar S. "Regulation of functional diversity within the Nedd4 family by accessory and adaptor proteins". *Bioessays* 2006; 28:617-28.
- Sheets M.F., Kyle J.W., Kallen R.G., Hanck D.A. "The Na channel voltage sensor associated with inactivation is localised to the external charged residues of domain IV, S4" *Biophys J* 1999; 77: 747-757
- Schaller K.L., Caldwell J.H. "Developmental and regional expression of sodium channel isoform NaCh6 in the rat central nervous system". *J Comp Neurol* 2000; 420: 84-97
- Scheffer I.E., Berkovic S.F. "Generalized epilepsy with febrile seizures plus: a genetic disorder with heterogeneous clinical phenotypes" *Brain* 1997; 120: 479-490
- Scheffer I.E., Harkin L.A., Grinton B.E., Dibbens L.M., Turner S.J., Zielinski M.A., Xu R., Jackson G., Adams J., Connellan M., Petrou S., Wellard R.M., Briellmann R.S., Wallace R.H., Mulley J.C., Berkovic S.F. "Temporal lobe epilepsy and GEFS+ phenotypes associated with SCN1B mutations" *Brain* 2007; 130: 100-109
- Schlieff T, Schonherr R, Imoto K, Heinemann SH (1996) Pore properties of rat brain II sodium channels mutated in the selectivity filter domain. *Eur Biophys J* 25:75-91.
- Scheuer T. "Structure and function of voltage-gated sodium channels: regulation by phosphorylation." *Biochem Soc Trans* 1994;22:479-82.
- Shah V.N., Wingo T.L., Weiss K.L., Williams C.K., Balser J.R., Chazin W.J. "Calcium-dependent regulation of the voltage-gated sodium channel hH1: intrinsic and extrinsic sensors use a common molecular switch". *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:3592-7.
- Shao D., Okusec K, Djamoza M.B.A. "Protein-protein interactions involving voltage-gated sodium channels: Post-translational regulation, intracellular trafficking and functional expression". *Int J Biochem & Cell Biol* 2009; 41:1471-1481
- Shi X., Yasumoto S., Nakagawa E., Fukasawa T., Uchiya S., Hirose S. "Missense mutation of the sodium channel gene SCN2A causes ravet syndromes" *Brain Develop* 2009; 31(10):758-762
- Sigel H., Baur R. "Activation of protein kinase C differentially modulates neuronal  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\gamma$ -aminobutyrate type A channels" *PNAS* 1988; 85: 6192-6196
- Singh N.A., Charlier C., Stauffer D., DuPont B.R., Leach R.J., Melis R., Ronen G.M., Bjerre I., Quattlebaum T., Murphy J.V., McHarg M.L., Gagnon D., Rosales T.O., Peiffer

- A., Anderson V.E., Leppert M. "A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns". *Nat Genet* 1998; 18: 25–29
- Singh N.A., Pappas C., Dahle E.J., et al. "A role of SCN9A in human epilepsies, as a cause of febrile seizures and as a potential modifier of Dravet syndrome". *PLoS Genet* 2009; 5: e1000649.
- Smallwood P.M., Munoz-Sanjuan I., Tong P., Macke J.P., Hendry S.H., Gilbert D.J., Copeland N.G., Jenkins N.A., Nathans J. "Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors: new members of the FGF family implicated in nervous system development". *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9850–9857
- Soldovieri M.V., Miceli F., Bellini G. "Correlating the clinical and genetic features of benign familial neonatal seizures (BFNS) with the functional consequences of underlying mutations". *Channels* 2007; 1:228–33.
- Somjen G.G "Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization" *Physiol Rev.* 2001; 81(3): 1065-96
- Spampanato J., Escayg A., Meisler M.H., Goldin A.L. "Functional effects of two voltage-gated sodium channel mutations that cause generalized epilepsy with febrile seizures plus type 2" *J Neurosci* 2001; 21: 7481-7490
- Spampanato J., Kearney J.A., de Haan G., McEwen P.D., Escayg A., Aradi I., Macdonald B.T., Levin S.I., Soltesz I., Montalenti E., Isom L.L., Goldin A.L., Meisler M.H. "A novel epilepsy mutation in the sodium channel SCN1A identifies a cytoplasmic domain for  $\beta$  subunit interaction" *J Neurosci* 2004; 24(44): 10022-10034
- Specchio N., Vigeveno F. "The spectrum of benign infantile seizures". *Epil Res* 2006; 70:156–167
- Steele D.F., Eldstrom J., Fedida D. "Mechanisms of cardiac potassium channel trafficking." *J Physiol* 2007;582:17–26.
- Stevens E.B., Cox P.J., Shah B.S., Dixon A.K., Richardson P.J., Pinnock R.D., Lee K. "Tissue distribution and functional expression of the human voltage-gated sodium channel  $\beta$ 3 subunit" *Pflugers Arch.* 2001; 441, 481-488
- Sthumer W., Conti F., Suzuki H., Wang X., Noda M., Yahadi N., Kubo H., Numa S. "Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel" *Nature* 1989; 339: 597-603
- Steinlein O.K., Mulley J.C., Propping P., Wallace R.H., Phillips H.A., Sutherland G.R., Scheffer I.E., Berkovic S.F. "A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy". *Nat Genet* 1995; 11: 201-203.
- Stocker P.J., Bennett E.S. "Differential sialylation modulates voltage-gated Na<sup>+</sup> channel gating throughout the developing myocardium." *J Gen Physiol* 2006; 127: 253–65.
- Striano P., Bordo L., Lispi M.L., Specchio N., Minetti C., Vigeveno F., Zara F. "A novel SCN2A mutation in family with benign familial infantile seizures". *Epilepsia* 2006; 47: 218–220
- Striessnig J., Glossmann H., Catterall W.A. "Identification of a phenylalkylamine binding region within the alpha 1 subunit of skeletal muscle Ca<sup>2+</sup> channels", *Proc Nat Acad Sci USA* 1990; 87: 9108-9112

- Suguwara T., Tsurubuchi T., Agarwala K.L., Ito M., Fukuma G., Mazaki-Myiazaki E., Nagafuji H., Noda M., Imoto K., Wada K., Mitsudome A., Kaneko S., Montal M. "A missense mutation of the Na<sup>+</sup> channel alpha II subunit gene Na<sub>v</sub>1.2 in a patient with febrile and afebrile seizures causes channel dysfunction" *PNAS* 2001; 98: 2690-2698
- Suguwara T., Tsurubuchi T., Fujiwara T., Mazaki-Myiazaki E., Nagata E., Montal M., Inoue Y., Tamakawa K. "Nav1.1 channels with mutations of severe myoclonic epilepsy in infancy display attenuated currents". *Epil Res* 2003; 54:201-207
- Svenningsson P., Chergui K., Rachleff I., Flajolet M., Zhang X., El Yacoubi M. "Alterations in 5-HT1B receptor function by p11 in depression-like states". *Science* 2006; 311:77-80.
- Takao K., Yoshii M., Kanda A., Kokubun S., Nukada T. "A region of the muscarinic-gated atrial K<sup>+</sup> channel critical for activation by G protein  $\beta\gamma$  subunits" *Neuron* 1994; 13: 747-755
- Tammaro P., Conti F., Moran O. "Modulation of sodium current in mammalian cells by an epilepsy-correlated  $\beta$ 1-subunit mutation" *Biochem Biophys Res com* 2002; 291: 1095-1101
- Tang B., Dutt K., Papale L., Rusconi R., Shankar A., hunter J., Tufik S., Yu F.H., Catterall W.A., Mantegazza M., Goldin A.L., Escayg A. "A BAC transgenic mouse model reveals neuron subtype-specific effects of a generalized epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+) mutation". *Neurobiol Dis* 2009; 35: 91-102.
- Theoharis N.T., Sorensen B.R., Theisen-Toupal J., Shea M.A. "The neuronal voltage-dependent sodium channel type II IQ motif lowers the calcium affinity of the C-domain of calmodulin". *Biochem* 2008; 47:112-23.
- Ukomadu C., Zhou J., Sigworth F.J., Agnew W.S. " $\mu$ l Na<sup>+</sup> channels expressed transiently in human embryonic kidney cells: biochemical and biophysical properties" *Neuron* 1992, 8, 663-6
- van Bemmelen M.X., Rougier J.S., Gavillet B., Apotheloz F., Daidie D., Tateyama M. "Cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5 is regulated by Nedd4-2 mediated ubiquitination". *Circ Res* 2004;95:284-91.
- Van Wart A., Trimmer J.S., Matthews G. "Polarized distribution of ion channels within microdomains of the axon initial segment". *J Comp Neurol* 2007; 500:339-352
- Vanmolkot K.R., Babini E., de Vries B., Stam A.H., Freilinger T., Terwindt G.M., Norris L., Haan J., Frants R.R., Ramadan N.M., Ferrari D.M., Pusch M., van den Maagdenberg A., Dichgans M. "The novel p.L1649Q mutation in the SCN1A epilepsy gene is associated with familial hemiplegic migraine: genetic and functional studies" *Human Mut* 2007; 28 (5): 522
- Vassilev P.M., Scheuer T., Catterall W.A. "Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation" *Science* 1988; 241: 1658-1661
- Vassilev P.M., Scheuer T., Catterall W.A. "Inhibition of inactivation of single sodium channels by a site-directed antibody" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989; 86: 8147-8151
- Vijayaragavan K., Boutjdir M., Chahine M. "Modulation of Nav1.7 and Nav1.8 peripheral nerve sodium channels by protein kinase A and protein kinase C". *J Neurophysiol* 2004; 91:1556-69.
- Vilin Y.Y., Fujimoto E., Ruben P.C. "A single residue differentiates between human cardiac and skeletal muscle Na<sup>+</sup> channel slow inactivation" *Biophys.* 2001; 80: 2221-2230

- Vreugdenhil M., Hoogland G., van Veelen C.W., Wadman W.J. "Persistent sodium current in subicular neurons isolated from patients with temporal lobe epilepsy". *Eur J Neurosci* 2004; **19**: 2769–78.
- Wada A., Yanagita T., Yokoo H., Kobayashi H. "Regulation of cell surface expression of voltage-dependent Nav1.7 sodium channels: mRNA stability and posttranscriptional control in adrenal chromaffin cells". *Front Biosci* 2004; **9**:1954–66.
- Waeber C. and Moskowitz M.A. "Therapeutic implications of central and peripheral neurologic mechanisms in migraine". *Neurol* 2003; **61**:S9-20.
- Wallace R.H., Wang D.W., Singh R. "Febrile seiuzures and generalized epilepsy associated with a mutation in the sodium channel B1 subunit gene SCN1B". *Nat Gen* 1998; **19**(4): 366-370.
- Wallace R.H., Marini C., Petrou S., Harkin L.A., Bowser D.N., Panchal R.G., Williams D.A., Sutherland G.R., Mulley J.C., Scheffer I.E., Berkovic S.F. "Mutant GABA-A receptor  $\gamma$ 2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures" *Nat Gens* 2001b; **28**: 49-52
- Wang Q., McEwen D.G., Ornitz D.M. "Subcellular and developmental expression of alternatively spliced forms of fibroblast growth factor 14". *Mech Dev* 2000; **90**: 283–287.
- Wang Q., Bardgett M.E., Wong M., Wozniak D.F., Lou J., McNeil B.D., Chen C., Nardi A., Reid D.C., Yamada K., Ornitz D.M. "Ataxia and paroxysmal dyskinesia in mice lacking axonally transported FGF14". *Neuron* 2002; **35**, 25–38.
- Watabe H., Valencia J.C., Le Pape E., Yamaguchi Y., Nakamura M., Rouzaud F. "Involvement of dynein and spectrin with early melanosome transport and melanosomal protein trafficking". *J Invest Dermatol* 2008; **128**:162–74.
- Watanabe E., Hiyama T.K., Noda M. "Na<sub>x</sub> sodium channel is expressed in non myelinated Schwann cells and alveolar type II cells in mice" *Neurosci. Lett.* 2002; **330**: 109-113
- West J.W., Nur-mann R., Murphy B.J., Scheuer T., Catterall W.A. "A phosphorylation site in the Na<sup>+</sup> channel requires for modulation by protein kinase C" *Science* 1991; **254**: 866-868
- West J.W., Scheuer T., Maechler L., Catterall W.A. "Efficient expression of rat brain type-IIA Na<sup>+</sup> channel  $\alpha$  subunits in a somatic cell line" *Neuron* 1992, **8**, 59-70
- Westenbroek R.E., Merrick D.K., Catterall W.A. "Differential subcellular localization of the R<sub>I</sub> and R<sub>II</sub> Na<sup>+</sup> channel subtypes in central neurons" *Neuron* 1989; **3**: 695-704
- Whitaker WR, Faull RL, Waldvogel HJ, Plumpton CJ, Emson PC, Clare JJ "Comparative distribution of voltage-gated sodium channel proteins in human brain". *Brain Res Mol Brain Res* 2001; **88**:37-53.
- Wingo T.L., Shah V.N., Anderson M.E., Lybrand T.P., Chazin W.J., Balser J.R. "An EF-hand in the sodium channel couples intracellular calcium to cardiac excitability". *Nat Struct Mol Biol* 2004; **11**:219–25.
- Wittmack E.K., Rush A.M., Craner M.J., Goldfarb M., Waxman S.G., Dib-Hajj S.D. "Fibroblast growth factor homologous factor 2B: association with Nav1.6 and selective colocalization at nodes of Ranvier of dorsal root axons" *J Neurosci* 2004; **24**: 6765-6775
- Wong H.K., Sakurai T., Oyama F., Kaneko K., Wada K., Miyazaki H., Kurosawa M., De Stropper B., Saftig P., Nukina N. " $\beta$  -subunits of voltage-gated sodium channels are novel

substrates of  $\beta$ -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme (BACE1) and  $\gamma$ -secretase" *J Biol Chem* 2005; 280: 23009-23017

Xu R., Thomas E.A., Gazina E.V., Richards K.L., Quick M., Wallace R.H., Harkin L.A., Heron S.E., Berkovic S.F., Scheffer I.E., Mulley J.C., Petrou S. "Generalized epilepsy with febrile seizures plus-associated sodium channel  $\beta$ 1 subunit mutations severely reduce beta subunit-mediated modulation of sodium channel function" *Neurosci* 2007; 148: 164-174

Yang P., Kupersmidt S., Roden D.M. "Cloning and initial characterization of the human cardiac sodium channel (SCN5A) promoter." *Cardiovasc Res* 2004;61:56-65.

Yang N.B., Horn R. "Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channel" *Neuron* 1995; 15: 213-218

Yang N.B., George A.L.Jr., Horn R. "Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels" *Neuron* 1996; 16: 113-122

Young K.A., Caldwell J.H. "Modulation of skeletal and cardiac voltage-gated  $\text{Na}^+$  channels by calmodulin" *J Physiol* 2005; 565: 349-70

Yu E.J., Ko S.H., Lenkowski P.W., Pance A., Patel M.K., Jackson A.P. "Distinct domains of the sodium channel  $\beta$ 3-subunit modulate channel-gating kinetics and subcellular location" *Biochem J* 2005; 392: 519-526

Yu F.H., Westenbroek R.E., Silos-Santiago I., McCormick K.A., Lawson D., Ge P., Ferriera H., Lilly J., DiStefano P., Catterall W.A., Scheuer T., Curtis R. "Sodium channel  $\beta$ 4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to  $\beta$ 2" *J Neurosci* 2003, 23(20): 7577-7585

Yu F.H., Mantegazza M., Westenbroek R.E., Robbins C.A., Kalume F., Burton K.A., Spain W.J., McKnight G.S., Scheuer T., Catterall W.A. "Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy of infancy" *Nat Neurosci* 2006; 9 (9): 1142-9

Zhang Z.N., Li Q., Liu C., Wang H.B., Wang Q., Bao L. "The voltage-gated  $\text{Na}^+$  channel Nav1.8 contains an ER-retention/retrieval signal antagonized by the  $\beta$ 3 subunit". *J Cell Sci* 2008; 121:3243-52.

Zhou J.Y., Potts J.F., Trimmer J.S., Agnew W.S., Sigworth F.J. "Multiple gating modes and the effects of modulating factors on the  $\mu$ l sodium channel" *Neuron* 1991, 7, 775-785

Zhou J., Shin H.G., Yi J., Shen W., Williams C.P., Murray K.T. "Phosphorylation and putative ER retention signals are required for protein kinase A-mediated potentiation of cardiac sodium current." *Circ Res* 2002; 91:540-6